

**ZUM VERHALTEN EINIGER HYDROLASEN UND
OXYDOREDUKTASEN IN DER AORTENWAND DER RATTE**

Christine Merkle

München
1971

Aus dem Institut für Allgemeine Pathologie und
Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Vorstand: Professor Dr. E. Dahme

ZUM VERHALTEN EINIGER HYDROLASEN
UND OXYDOREDUKTASEN IN DER AORTENWAND DER RATTE.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Christine Merkle

aus
Kempten

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München.

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. E. Dahme
Korreferent: Prof. DDr. DDr.h.c. J. Brüggemann

Tag der Promotion: 5. Februar 1971



Die Arbeit wurde mit dankenswerter Unterstützung
der Weltgesundheits-Organisation (WHO) und der
Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG	1
LITERATURÜBERSICHT	2
I. Enzymhistochemie der normalen Aortenwand verschiedener Tierarten.	2
II. Unterschiedliche Enzymausstattung bei männlichen und weiblichen Ratten.	5
III. Das Auftreten von Enzymen in der Aortenwand beim Embryo und post partum.	6
IV. Enzymmusteränderungen in der Aortenwand mit zunehmendem Alter.	7
PROBLEMSTELLUNG	10
EIGENE UNTERSUCHUNGEN	11
MATERIAL	11
METHODIK	11
ERGEBNISSE: HYDROLASEN	15
I. Esterasen	15
A. Phosphoesterasen	15
1. Alkalische Phosphatase	15
2. Saure Phosphatase	16
B. Carboxylesterasen	16
1. Lipase	16
2. Unspezifische Esterase	17
3. Naphthol-AS-Esterase	18
4. Cholinesterase	19
II. Glycosidasen	19
B-Glucuronidase	19
III. Peptidasen	20
Leucinaminopeptidase	20

	Seite
IV. Polyphosphatasen	21
Adenosintriphosphatase	21
OXYDOREDUKTASEN	22
I. Aerobe Transhydrogenasen	22
Monoaminoxidase	22
II. Anaerobe Transhydrogenasen	22
A. NAD-unabhängige Transhydrogenasen	22
Succinatdehydrogenase	22
B. NAD-abhängige Transhydrogenasen	23
1. Laktatdehydrogenase	24
2. Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	25
3. β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase	26
4. Glutamatdehydrogenase	26
5. α -Glycerophosphatdehydrogenase	27
III. Aerobe Transelektroasen	28
Cytochromoxydase	28
IV. Anaerobe Transelektroasen	29
NADH-Tetrazolium-Reduktase	29
DISKUSSION	
I. Zur Topochemie der Enzyme in der Aortenwand.	30
II. Aktivitätsunterschiede zwischen Brust- und Bauchaorta.	33
III. Entwicklung der Aortenwandstruktur und des Enzymmusters im Embryo und post partum.	34
IV. Die Enzymaktivität im Alter.	37
V. Einfluß des Geschlechts auf die Enzymakti- vität der Aortenwand.	38
VI. Das Enzymmuster der Tumorratten.	39
ZUSAMMENFASSUNG	42
LITERATURVERZEICHNIS	44

EINLEITUNG

Enzyme gehören zur Gruppe der Proteine und wirken im Stoffwechsel einer lebenden Zelle bzw. eines Organismus ähnlich wie Katalysatoren in der anorganischen Chemie. Sie setzen die Aktivierungsenergie, die zu einer chemischen Reaktion notwendig ist, herab und ermöglichen die Gleichgewichtseinstellung der Reaktion. Das Enzym reagiert mit dem ihm entsprechenden Substrat, es bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex, der dann in das endgültige Reaktionsprodukt und das regenerierte Enzym zerfällt.

Auf Grund der Substrat- und Wirkungsspezifität eines Enzyms kann bei seinem Vorkommen in einem Gewebe eine sichere Aussage auf einen bestimmten Stoffwechselvorgang gemacht werden. Diese Aussage kann nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ verwertet werden, da sich die prosthetischen Gruppen der Enzyme stöchiometrisch mit dem Substrat umsetzen. Enzymaktivitäten können deshalb biochemisch erfaßt werden. Allerdings hat die biochemische Methode den Nachteil, daß sie keinen sicheren Aufschluß über die Lokalisation der Enzyme in einem Gewebe gibt.

Zur Klärung der Frage der Lokalisation bietet sich die Enzymhistochemie an. Dabei werden histologische Gewebeschnitte in Substratlösungen bei bestimmten Bedingungen inkubiert, das Reaktionsprodukt verbindet sich während (simultane Reaktion) oder nach (sucedane Reaktion) der Inkubation mit einer Kupplersubstanz, so daß ein farbig-er Niederschlag an Orten mit Enzymaktivität entsteht.

Albinoratten dienen häufig als Versuchstiere zum Studium von Blutgefäßwandstoffwechselstörungen. Daher erscheint es notwendig, um einen möglicherweise gestörten Enzymhaushalt in der Gefäßwand näher beurteilen zu können, die physiologische Enzymtopochemie in der Aortenwand von Ratten verschiedener Altersstufen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen und kennenzulernen.

LITERATURÜBERSICHT

I. Enzymhistochemie der normalen Aortenwand verschiedener Tierarten.

Histochemische Ergebnisse über das Enzymmuster in der normalen Aortenwand verschiedener Tierarten liegen vor allem in Arbeiten über induzierte Atherosklerose vor, in denen zum Vergleich mit den Versuchstieren Kontrolltiere herangezogen werden. Es folgen Befunde über die H y d r o l a s e n:

Die alkalische Phosphatase (aPase) wird bei verschiedenen Tierarten nur in der Adventitia der Aorta gefunden, dort insbesondere in den Endothelien der Vasa vasorum - so beim Kaninchen (LOJDA und ZEMPLÉNYI 1961), beim Miniaturschwein, das bereits mit 2 - 3 Jahren spontane, arteriosklerotische Plaques aufweist (STAVROU 1970), bei Mensch und Hund (SANDLER und BOURNE 1963) und bei der Ratte (HESS und STÄUBLI 1963).

Dagegen ist die saure Phosphatase (sPase) im Endothel und in der Media der Kaninchenaorta (LOJDA und ZEMPLÉNYI), beim Miniaturschwein in Endothel und Bindegewebelementen durch eine positive Reaktion vertreten (STAVROU). Von der Ratte berichten HESS und STÄUBLI, daß die sPase in Endothel und Adventitia stärker hervortritt als in der unregelmäßig gefärbten Media.

Ebenso wie die meisten hydrolytischen Enzyme in der Aorta der Ratte gegenüber anderen Arten (Mensch und Kaninchen) eine besonders ausgeprägte Intensität entwickeln, weisen auch beide Phosphatasen bei der Ratte sowohl biochemisch als histochemisch eine sehr hohe Aktivität auf.

Während beim Kaninchen unspezifische Esterase (uE) und Naphthol-AS-Esterase (AS-E) in Media und Adventitia vorkommen (LOJDA und ZEMPLÉNYI), erscheinen diese Enzyme beim Miniaturschwein außer in Bindegewebelementen auch im Aortenendothel (STAVROU). Von HESS

und STÄUBLI wird über ein unregelmäßiges Vorkommen der Indoxylesterase im Endothel der Rattenaorta berichtet, daneben aber dasselbe Verteilungsmuster wie beim Kaninchen beschrieben mit einer deutlichen Aktivitätszunahme zur äußeren Mediazone hin.

Die Acetylcholinesterase (AChE) zeigt bei Kaninchen (ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ 1963) und Ratte (HESS und STÄUBLI) in der Media eine positive Reaktion, die in der Rattenaorta nach außen zunimmt.

Die Lipase (Tween-E) ist in der Adventitia der Kaninchenaorta sehr schwach vorhanden, beim 2-3jährigen Miniaturschwein beschränkt sich die Lokalisation der Tween-E auf arteriosklerotische Plaques (LOJDA und ZEMPLÉNYI, STAVROU). Auch bei den Esterasen zeichnet sich die Ratte gegenüber anderen Tierarten durch eine besonders hohe lipolytische und esterolytische Aktivität aus. So liegt bei der uE, AS-E und Tween-E in den Mediamuskelzellen der Ratte eine fünfmal höhere Aktivität als beim Kaninchen vor.

β -Glucuronidase (β -Gr) findet sich bei Kaninchen und Miniaturschwein in Endothel und Media der Aortenwand. Auch hier erweist sich die Enzymintensität bei der Ratte höher als beim Kaninchen (ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ, STAVROU).

Leucinaminopeptidase (LAP) wird bei Kaninchen (LOJDA und ZEMPLÉNYI) und Schwein (STAVROU) in Endothel und Media der Aorta nachgewiesen, beim Schwein nimmt die Aktivität zur Adventitia hin zu. HASHIMOTO und KOBERNICK (1964) jedoch konnten in der Kaninchenaorta keine LAP feststellen, hingegen erzielten HESS und STÄUBLI in der Adventitia der Rattenaorta eine positive Reaktion.

Sowohl beim Kaninchen (ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ) als auch bei Schwein (STAVROU) und Ratte (HESS und

STÄUBLI) enthalten Endothel und Media der Aortenwand Adenosintriphosphatase (ATPase). Bei der Ratte erweist sich wiederum die Gesamtintensität höher als bei anderen Arten (ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ). Auch erscheint das Enzym in der Rattenmedia aktiver als in Endothel und Adventitia.

Von den O x y d o r e d u k t a s e n bildet die Monoaminoxidase (MAO) beim Schwein (STAVROU) eine positive Reaktion in Intima und Media aus.

Beim Kaninchen (ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ) reagieren unter den Dehydrogenasen die NADH-Tetrazolium-Reduktase (NADH-R) und die Laktatdehydrogenase (LDH) am intensivsten, es folgen mit abnehmender Aktivität: α -Glycerophosphatdehydrogenase (α -GDH), Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH), β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase (β -HDH) und noch schwächer Glutamatdehydrogenase (GDH) und Succinatdehydrogenase (SDH). Beim Schwein (STAVROU) ergibt sich eine weitgehende Ähnlichkeit mit der Intensitätsfolge beim Kaninchen, mit Ausnahme der G-6-PDH, die beim Schwein von allen Dehydrogenasen am schwächsten reagiert und nach β -HDH und SDH eingestuft wird.

Die Aktivität dieser Dehydrogenasen ist beim Kaninchen (ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ) in den Muskelzellen der Media am stärksten vertreten - stärker als in Endothel und Adventitia. Eine Ausnahme davon macht die G-6-PDH, die im Endothel der Kaninchenaorta eine intensivere Aktivität erreicht als in der Media. Bei der Ratte kommt die G-6-PDH HESS und STÄUBLI zufolge ebenfalls vermehrt im Endothel vor, während SANDLER und BOURNE dagegen die G-6-PDH in der Media als aktiver nachweisen. In der Aortenwand von Mensch und Ratte erhalten SANDLER und BOURNE übereinstimmend mit den oben angegebenen Befunden am Kaninchen ebenfalls eine höhere Aktivität in der Media.

Auch die LDH folgt in der Rattenaorta diesem Verteilungsprinzip (HESS und STÄUBLI), während das Enzym in der Kaninchenaorta wie die G-6-PDH vor allem an das Endothel gebunden erscheint (ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ).

SDH wird von HESS und STÄUBLI in der Rattenmedia als schwach und unregelmäßig beschrieben, dagegen erzielen SANDLER und BOURNE beim Hund im äußeren Media-drittel und in der Adventitia eine beachtenswerte SDH-Aktivität, die in Richtung Endothel abnimmt.

Glycerol-1-Phosphat-Menadion-Reduktase (entspricht der α -GDH) ist in der Rattenaorta in Endothel und Media gleich aktiv (HESS und STÄUBLI).

Cytochrom-Oxydase (Cyt-Ox) kann bei Kaninchen (ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ), Mensch, Hund und Ratte (SANDLER und BOURNE, HESS und STÄUBLI) in der Aortenwand nachgewiesen werden, wenn Cytochrom c zugegeben wird. Beim Kaninchen reagiert neben der Media das Endothel positiv, bei der Ratte Media und Adventitia.

II. Unterschiedliche Enzymausstattung bei männlichen und weiblichen Ratten.

Bezüglich einer unterschiedlichen Enzymausstattung bei männlichen und weiblichen Ratten, wurde von OKA, BRODIE und ANGRIST (1968) zu einigen Enzymen (aPase, ATPase, NADH-R) Stellung genommen. Alkalische Phosphatase wird wiederum nur im umgebenden Bindegewebe, nicht in der Gefäßwand angetroffen.

Bei 3 Monate alten Ratten zeigen sich bei allen untersuchten Enzymen keine Geschlechtsunterschiede. Mit 5 Monaten weisen weibliche Tiere höhere ATPase Aktivität auf als männliche, dasselbe Ergebnis tritt auch bei Ratten auf, die älter als 2 Jahre sind. NADH-R ist bei

alten, männlichen Tieren unregelmäßiger und fleckiger verteilt als bei weiblichen Tieren gleichen Alters.

WEXLER und JUDD (1966) konnten ein unterschiedliches Verhalten der β -Gr bei männlichen und weiblichen Ratten feststellen. Tiere beiderlei Geschlechts entwickeln schon nach der ersten oder zweiten Aufzucht von Jungen mikroskopisch sichtbare, arteriosklerotische Veränderungen, wobei aber in der gesamten Aorta sowohl biochemisch als histochemisch keine β -Gr-Aktivität gefunden werden kann. Bei den weiblichen Ratten verstärken sich die Veränderungen nach weiteren Trächtigkeiten zu makroskopisch sichtbaren Läsionen, welche zuerst in der Bauchaorta auftreten. Diese stark arteriosklerotisch veränderten Aorten von weiblichen Ratten weisen in Media und Adventitia im Bereich degenerierender Grundsubstanz und dystrophischer Verkalkungsherde eine hohe β -Gr-Aktivität auf, deren Intensität mit dem Grad der Arteriosklerose zunimmt.

Von KIRK (1969) wurden durch biochemische Untersuchungen einige Enzymintensitätsunterschiede bei verschiedenen Geschlechtern gefunden. Die aPase tritt bei männlichen Tieren etwas stärker hervor als bei weiblichen.

Zudem ergeben sich bei diesem Enzym nach ALBRECHT (1963) Saisonunterschiede in der Intensität, die im Winter höher ist als im Sommer. Bei weiblichen Ratten beträgt der Unterschied 50 %, bei männlichen Ratten 30 %. Weibliche Ratten übertreffen männliche hinsichtlich ihrer Aktivität an Lipoprotein-Lipase. Entgegen dem Befund von WEXLER und JUDD besitzen männliche Ratten mehr β -Gr-Aktivität als weibliche Tiere.

III. Das Auftreten von Enzymen in der Aortenwand beim Embryo und post partum.

ROSSI unternahm 1964 histochemische Enzymuntersuchungen am Gefäßsystem in der pränatalen Entwicklungsstufe.

APase tritt beim 1 Monate alten, menschlichen Embryo im Endothel der Aorta auf. Auch das umgebende Mesenchym reagiert positiv, während später nur noch das perivaskuläre Mesenchym anfärbbar ist. Bei der Ratte kann am 12. Tag der pränatalen Entwicklung im ganzen Gefäßapparat keine Enzymwirkung gefunden werden. Während das Mesenchym mancher Gefäßwände in menschlichen Embryonen sPase-haltig ist, erscheinen andere Gefäße enzymfrei. Die uE ergibt bei menschlichen Embryonen im 1. und 2. Monat in der Tunica media der Aorta eine positive Reaktion. Ebenso ist in Endothel und Media eine β -Gr Aktivität nachweisbar.

HIGGINBOTHAM und HIGGINBOTHAM (1968) berichten über die Entwicklung von Nucleotidpyrophosphatasen in der Aortenwand von neugeborenen und jungen Beagle-Hunden. Bei Neugeborenen weist die ATPase im Aortenendothel und in den Vasa vasorum starke Aktivität auf. Sind die Hunde 4 Wochen alt, so erscheint die ATPase auch in den Muskelzellen der Media, in der die Aktivität zwar nach außen hin zunimmt, jedoch nicht die Intensität der ATPase im Endothel erreicht. Nach 8 Wochen betrachten die Autoren die Gewebedifferenzierung als abgeschlossen und das Enzymmuster gleich dem des erwachsenen Hundes.

IV. Enzymmusteränderungen in der Aortenwand mit zunehmendem Alter.

Über eine Veränderung des Enzymmusters in der Aortenwand mit steigendem Alter liegen vorerst hauptsächlich biochemische Untersuchungen vor. KIRK untersuchte etwa 90 Enzyme am alternden Menschen und verglich die Ergebnisse mit ähnlichen, in der Literatur niedergelegten Beobachtungen an Tieren. Auf die bei Mensch und Ratte erzielten Ergebnisse sei im folgenden kurz eingegangen.

Von den H y d r o l a s e n zeichnen sich die Phosphatasen bei der Ratte, wie schon erwähnt, durch sehr hohe Intensität aus, die lediglich bei der aPase mit dem Alter abnimmt.

Die uE übertrifft in der menschlichen Aorta die Lipase an Aktivität. Die Lipoprotein-Lipase zeigt bei der Ratte eine hohe Intensität, die bei sehr jungen Tieren deutlich niedriger ist als bei erwachsenen; sie erreicht ihren Höhepunkt mit etwa 7 Monaten und fällt ab dem 12. Monat ab (ZEMPLÉNYI und GRAFNETTER 1959). Bei Erwachsenen erreicht die β -Gr nur ein niedriges Aktivitätsniveau, das jedoch während der Kindheit höher liegt und auch im Alter ansteigt. LAP dagegen verliert im Alter an Intensität. Die Aortenwand von Mensch und Ratte ist reich an ATPase, deren Gehalt in der menschlichen Aorta im Alter ebenfalls geringer wird. Die Ratte soll bis zu 2 Jahren ihre Aktivität in der Aorta vermehren (KAHN und SLOCUM 1967), was aber von anderen Autoren (CARR, BELL und KRANTZ 1952) bestritten wird.

Von den O x y d o r e d u k t a s e n berichtet KIRK über die SDH, daß das Enzym in der Aortenwand des Menschen auch altersbedingt an Aktivität verliert, dagegen soll zwischen Ratten im Alter von 1, 14 und 18 Monaten kein Unterschied zu erkennen sein.

LDH zeigt in der menschlichen Aortenwand eine hohe Enzymaktivität, die von derjenigen der Ratte noch übertroffen wird. Die Intensität ist bei Kindern nur halb so groß wie bei Erwachsenen; bis zum Alter von 60 Jahren erfolgt ein Anwachsen der Intensität, danach ein Absinken. G-6-PDH erfährt bei Mensch und Ratte keine altersbedingte Veränderung. GDH, β -HDH, α -GDH und NADH-R besitzen in der menschlichen Aorta eine starke Enzymintensität, die mit höherem Lebensalter hingegen abnimmt.

Die Aktivität der Cyt-Ox ist bei Kindern höher als bei Erwachsenen; auch die erwachsene Ratte zeigt in der Aorta nur ein Viertel der Intensität von drei Wochen alten Tieren.

LINDNER (1968) berichtet gleichfalls von einer Abnahme der meisten Oxydoreduktasen (des Kohlenhydratstoffwechsels, der Glykolyse, des Krebszyklus und des Pentose-Phosphat-Weges) mit dem Alter. Ebenso hat er eine altersbedingte Abnahme der meisten hydrolytischen Enzyme (Esterasen, Phosphatasen, Glucuronidasen und proteolytischen Enzyme) festgestellt.

PROBLEMSTELLUNG

Aus der Literaturübersicht wird ersichtlich, daß bezüglich der Enzymverteilungen und deren Veränderungen in der Aorta eines wachsenden bzw. älter werdenden Individuums lediglich systematische biochemische Untersuchungen vorliegen. Deshalb erschien es angebracht, an einer Tierart - der Ratte als einem häufig verwendeten Versuchstier - die Frage nach der topochemischen Veränderung des Enzymmusters mit zunehmendem Alter zu untersuchen; zudem sollte überprüft werden, wie sich die LDH-Isoenzyme anteilmäßig in der Aortenwand verhalten.

Damit war auch die Frage nach Enzymintensitätsunterschieden zwischen Brust- und Bauchaorta und zwischen Aorten männlicher und weiblicher Ratten gestellt, aus deren Beantwortung möglicherweise eine Beziehung zur unterschiedlichen Arterioskleroseanfälligkeit der oben genannten Abschnitte herzustellen war.

Weiterhin war zu prüfen, ob und inwieweit die chronische Zufuhr alkylierender Substanzen, die durch eine neurotrope, carcinogene Wirkung gekennzeichnet sind, einen Einfluß auf das Enzymmuster der Aortenwand auszuüben imstande ist.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

MATERIAL

Als Untersuchungsmaterial dienten 16 Sprague-Dawley Ratten verschiedenen Alters und Geschlechts; sie waren, neben einem Fetus, 1, 7, 8, 18 Tage, 1, 5, 6, 12, 18 Monate alt.

Im weiteren wurden 5 Ratten verschiedenen Geschlechts im Alter von 12, 13 und 15 Monaten untersucht, die nach chronischer Behandlung mit N-methyl-N-nitroso-harnstoff bzw. Phenyl-dimethyl-triazin neurogene Tumoren entwickelt hatten. Nähere methodische Angaben hierzu finden sich bei STAVROU (1969, 1970).

METHODIK

Die Ratten wurden unter Chloroformnarkose entblutet; die Bearbeitung der Aorten erfolgte unmittelbar nach der Tötung.

Um bei der Herstellung der histologischen Schnitte das Kollabieren der Aorten zu verhindern, wurde in die Aorta in situ eine Carboxymethylzelluloselösung injiziert (Verdünnung mit Wasser 1 : 30). Zwei Abschnitte - aus dem Thorakal- und aus dem Abdominalbereich der Aorta - wurden mit Fäden abgebunden, herausgeschnitten und bei -10°C steifgefroren. Die Segmente wurden anschließend in eine Carboxymethylzelluloselösung festerer Konsistenz eingebettet (Verdünnung mit Wasser 1 : 13). Die Carboxymethylzellulose verhielt sich gegenüber den histochemischen Färbemethoden neutral und wurde beim späteren Wässern der Präparate herausgelöst.

Aus den so vorbehandelten Aortenproben wurden mit dem WKF-1150 Kryotom bei -18°C bis -20°C Seriengefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 18μ (für die Lipase-reaktion mit einer Schnittdicke von 22μ) hergestellt.

Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger übertragen und bis zur darauffolgenden Durchführung der histochemischen Reaktion tiefgekühlt aufbewahrt.

Es wurden folgende 18 Enzyme mit der jeweils angegebenen Methode nachgewiesen:

A. Hydrolasen

- 1.) Alkalische Phosphatase (aPase) nach FEARSE (1961); als Substrat dient α -Naphthylphosphat, als Kupplersubstanz ein Diazoniumsalz (Variaminsalz VB).
- 2.) Saure Phosphatase (sPase) wurde nach BARKA (1960) und nach PÓSALAKY (1964) mit α -Naphthylphosphat und hexazotiertem Pararosanilin nachgewiesen.
- 3.) Lipase (Tween-E) nach GOMORI (1952) mit Tween 60 als Substrat, Calciumchlorid und Bleinitrat.
- 4.) Unspezifische Esterase (uE) nach DAVIS und ORNSTEIN (1959) mit α -Naphthylacetat als Substrat und hexazotiertem Pararosanilin als Kupplungssalz.
- 5.) Naphthol-AS-Esterase (AS-E) nach GÖSSNER (1958); als Substrat dient Naphthol-AS-Acetate, als Kupplungssalz Echtblau BB.
- 6.) Cholinesterase (ChE) nach NAIK (1963) mit Acetylcholinjodid und Kupfersulfat.
- 7.) β -Glucuronidase (β -Gr) nach SELIGMAN, TSON, RUTENBURG, und COHEN (1954); als Substrat dient 6-Brom-2-Naphthyl- β -D-Glucopyranosid und als Kupplersubstanz ein Diazoniumsalz (Fast Blue B Salz).
- 8.) Leucinaminopeptidase (LAP) wurde mit der Methode von NACHLAS, MONIS, SELIGMAN und ROSENBLATT (1960) nachgewiesen; als Substrat wird dabei L-Leucyl-4-methoxy-2-naphthylamid verwendet, als Kupplungssalz Echtblau B.

Nach einer älteren Methode von NACHLAS, CRAWFORD und SELIGMAN (1957) kann man neben dem gleichen Kupplungssalz auch das billigere L-Leucyl- β -naphthylamid verwenden.

- 9.) Adenosintriphosphatase (ATPase) wurde nach PADYKULA und HERMAN (1955) mit Adenosintriphosphat, Calciumchlorid und Kobaltnitrat nachgewiesen.

B. Oxydoreduktasen

- 10.) Monoaminoxydase (MAO) wurde nach GLENNER, BURTNER und BROWN (1957) mit Tryptaminhydrochlorid als Substrat und dem Tetrazoliumsalz Nitro-BT nachgewiesen.

- 11.) Succinatdehydrogenase (SDH) durch die Methode von NACHLAS, TSON, DE SOUZA, CHENG und SELIGMAN (1957) mit Na-Succinat und einem Tetrazoliumsalz (MTT).

Folgende Dehydrogenasen (12. - 16.) wurden in der Methode von HESS, SCARPELLI und PEARSE (1958) mit dem Tetrazoliumsalz Nitro-BT nachgewiesen:

- 12.) Laktatdehydrogenase (LDH), Substrat: Na-DL-Laktat.
- 13.) Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH), Substrat: Glucose-6-Phosphat-Na-Salz.
- 14.) β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase (β -HBDH), Substrat: DL- β -Hydroxybuttersäure-Na-Salz.
- 15.) Glutamatdehydrogenase (GDH), Substrat: Na-L-Glutamat.
- 16.) α -Glycerophosphatdehydrogenase (α -GDH), Substrat: Na-DL- α -Glycerophosphat.
- 17.) Tetrazolium-Reduktase (NADH-R) wurde nach SCARPELLI, HESS und PEARSE (1958) nachgewiesen mit reduziertem Nicotinamidadeninucleotid (NADH₂) als Substrat und Nitro-BT als Kupplungssalz.

Bei den Enzymnachweisreaktionen 12. - 17. wurden mit Rücksicht auf die sehr teuren Chemikalien nur etwa 3 - 4 ccm der Inkubationslösung hergestellt. Dies ist für eine Inkubation in Küvetten natürlich zu wenig, weshalb der Gewebeschnitt auf dem Objektträger an vier Seiten mit einer Paraffinschicht umgrenzt und die Inkubationslösung mit Pipetten aufgetropft werden mußte.

18.) Cytochrom-Oxydase (Cyt-Ox) wurde nach BURSTONE (1959, 1962) mit 1-Hydroxy-2-naphtoesäure und N-Phenyl-p-phenylendiamin nachgewiesen.

Weiterhin wurden die LDH-Isoenzyme der Aortenwand agar-gelelektrophoretisch aufgetrennt. Aus lebensfrischen Aorten von männlichen Ratten wurde unter Zusatz von Phosphat-Puffer (pH 7) mit dem Ultra-Turrax-Homogenisator eine 20 %ige Suspension zubereitet. Anschließend wurde diese Suspension in einer Christ-Ultrazentrifuge 15 min bei 20 000 U/min und einer Temperatur von 0° C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden Proben für die Elektrophorese entnommen. Die agar-gel-elektrophoretische Trennung der LDH-Isoenzyme sowie ihre Darstellung erfolgten nach Angaben von van der HELM (1962) und KNEDEL et al. (1966).

ERGEBNISSE

Im folgenden werden die 18 durchgeführten Enzymreaktionen besprochen. Ihre Einteilung lehnt sich an die Reihenfolge von ROSSI (1964) an. Die Enzyme werden nach den Empfehlungen der Internationalen Vereinigung für Biochemie benannt⁺), durch welche sie einen Trivialnamen, eine Kodenummer und eine systematische Bezeichnung erhalten haben.

HYDROLASEN

I. Esterasen

A. Phosphoesterasen

1. Alkalische Phosphatase (Phosphomonoesterase I, 3.1.3.1., Orthophosphorsäuremonoester-phosphohydrolase)

Phosphomonoesterasen hydrolysieren Orthophosphorsäuremonoester in Alkohol und anorganisches Phosphat, auch Phosphatübertragungen können von Phosphatasen katalysiert werden. Das pH-Optimum der aPase liegt zwischen 7 und 9.

Die aPase tritt in unseren Untersuchungen stark positiv in der Adventitia der Aortenwand auf. Während die Intima immer negativ erscheint, zeigen sich in der Tunica media (Taf. I, Abb. 2 und 3, ↑) in der äußeren Hälfte vereinzelte, positive Stellen. Die Abdominalaorta weist durchweg eine höhere Enzymaktivität auf als die Thorakalaorta (Taf. I, Abb. 2 und 3).

Die Intensität der aPase in der Adventitia ist schon in der 2. Lebenswoche so hoch wie beim erwachsenen Tier (Taf. I, Abb. 1 und 3).

⁺) Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. Pergamon Press, Oxford 1961.

TAFEL I

Alkalische Phosphatase

Abb.1

8 Tage alte Ratte,
Abdominalaorta, 120x



Abb.2

6 Monate alte
Ratte, Thorakal-
aorta, 48x

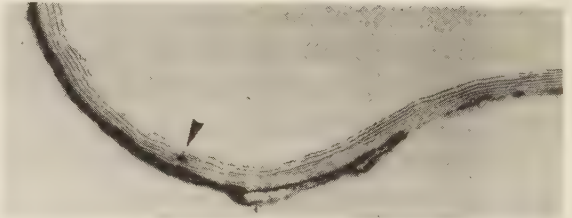


Abb.3

6 Monate alte
Ratte, Abdominal-
aorta, 48x

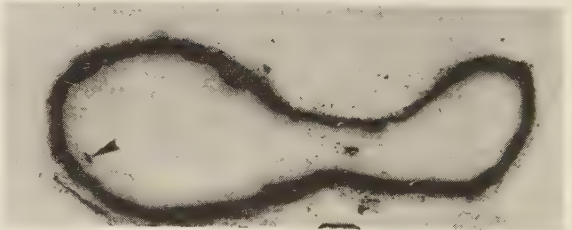
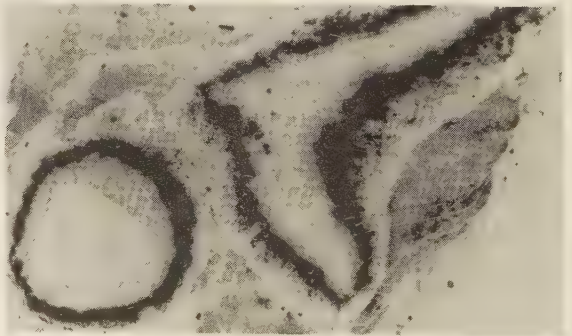


Abb.4

Tumorratte (32/
70), Abdominal-
aorta, 120x



Weibliche Ratten verfügen über mehr aPase als gleichaltrige, männliche Tiere.

Die Aortenwände der Tumorratten und der Kontrolltiere sind durch gleich starke Aktivität gekennzeichnet (Taf. I, Abb. 3 und 4).

2. Saure Phosphatase (Phosphomonoesterase II, 3.1.3.2.)

SPase, ein ausgesprochen lysosomales Enzym, hat die gleiche biochemische Wirkung wie die aPase, nur liegt ihr pH-Optimum bei 5.

Die Enzymaktivität ist in der äußeren Media und in der Adventitia stark positiv, eine sehr geringe Aktivität ist im Endothel und in der inneren Media festzustellen. Die Abdominalaorta weist in allen untersuchten Fällen eine höhere Intensität auf als die Thorakalaorta.

Beim Fetus ist nur eine äußerst schwache Reaktion vorhanden, die aber nach der Geburt stark zunimmt und mit 18 Monaten wieder an Intensität verliert.

Bei weiblichen Ratten ist die sPase im geringen Maße aktiver als bei gleichalten, männlichen Ratten.

Die Tumorratten zeigen keinen Unterschied zu den Normaltieren.

B. Carboxylesterasen

1. Lipase (3.1.1.3., Glycerinesterhydrolase)

Die Lipase katalysiert die Spaltung von relativ langkettigen Fettsäureestern mit etwa 8 - 18 Kohlenstoffatomen. Das verwendete Substrat Tween 60 besteht aus solchen langkettigen Fettsäuren, die mit Sorbit oder Mannit verestert sind.

Die Lipase erreicht in allen Schichten der Aortenwand nur eine schwache Aktivität; an den Polen der

Kerne der glatten Muskelzellen und in der Adventitia zeigt sich das Reaktionsprodukt am deutlichsten. Die Bauchaorta ist in der Regel aktiver als die Brust-aorta.

Beim Fetus wird eine intensivere Reaktion als beim 1 Tag alten Tier erreicht. Bis zu 12 Monaten nimmt die Enzymaktivität geringgradig zu, um dann mit derselben Intensität bestehen zu bleiben.

Weibliche Tiere weisen eine höhere Aktivität auf als gleichalte, männliche.

Tumorratten und Kontrolltiere unterscheiden sich nicht bezüglich ihrer Aktivität.

2. Unspezifische Esterase (3.1.1.1., Carboxylesterhydrolase)

Die uE hydrolysiert kurzkettige Fettsäureester mit 2 - 4 Kohlenstoffatomen.

Das Enzym ist in allen Schichten der Aortenwand aktiv, allerdings nur schwach in Intima und Adventitia. In der Media nimmt die Aktivität in Richtung auf das äußere Drittel erheblich zu und erreicht dort eine hohe Intensität (Taf. II, Abb. 2). Bis zum Alter von 1 Monat erweist sich die Bauchaorta aktiver als die Brustaorta. Bei 5 Monate alten und älteren Tieren erscheint die Media der Brustaorta gleichmäßig aktiv (Taf. II, Abb. 3) ohne die beschriebene Aktivitätszunahme, während die Media der Bauchaorta im inneren Drittel nahezu keine uE enthält, aber nach außen zu sehr intensiv reagiert (Taf. III, Abb. 4).

Mit steigendem Alter gewinnt die uE weiter an Intensität (Taf. II, Abb. 1, 2 und 3).

Das weibliche Tier besitzt hinsichtlich der uE eine aktivere Aorta als das männliche, gleichalte Tier (Taf. III, Abb. 4 und 5). Tumorratten weisen neben gleicher Enzymverteilung - die auch in Brust- und

Unspezifische Esterase

Abb.1

8 Tage alte Ratte,
Abdominalaorta, 120x



Abb.2

18 Tage alte Rat-
te, Abdominalaorta,
120x

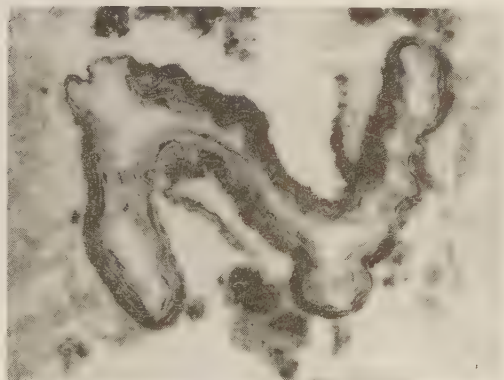


Abb.3

6 Monate alte Rat-
te, Thorakalaorta,
120x



Unspezifische Esterase

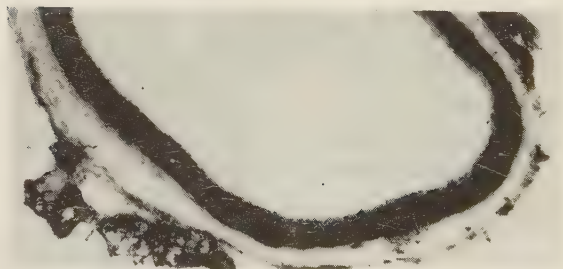
Abb.4

18 Monate alte
Ratte, männlich,
Abdominalaorta,
48x



Abb.5

18 Monate alte
Ratte, weiblich,
Abdominalaorta,
61x



Bauchaorta derjenigen der Normaltiere entspricht - gleiche Enzymintensität wie die Kontrolltiere auf.

3. Naphthol-AS-Esterase (3.1.1.1., Carboxylesterhydrolase)

Die AS-E spaltet wie die uE ebenfalls Acetat, das statt mit α -Naphthyl mit der Hydroxylgruppe von Naphthol-AS (2-Hydroxy-3-naphtholsäure-anilid) verestert ist. Das Naphthol wird zum Zweck der Ausschaltung von Diffusionsvorgängen auf diese Weise substituiert und so eine genauere Lokalisation erreicht.

Die AS-E zeigt in der Aortenwand ein ähnliches Verteilungsmuster wie die uE: Endothel, Media und Adventitia sind positiv, in der Media nimmt die Aktivität nach außen wieder stark zu (Taf. IV, Abb. 3). In der Brustaorta der neugeborenen Ratte (Taf. IV, Abb. 1) konzentriert sich die AS-E Aktivität besonders auf die äußere Media und auf die Adventitia. In der Bauchaorta (Taf. IV, Abb. 2) jedoch ist die Aktivität auf die gesamte Media verteilt, aber auch hier findet eine Enzymkonzentration in der äußeren Mediaschicht statt. Bei erwachsenen Ratten dagegen ist die Tunica media der Brustaorta von starker, gleichmäßiger Aktivität, während die Tunica media der Bauchaorta (Taf. IV, Abb. 3) - wie bei der uE - im inneren Drittel schwach aktiv erscheint; auch die Adventitia ist beim erwachsenen Tier nur noch wenig aktiv.

Die Enzymaktivität nimmt mit dem Alter zu. Geschlechtsunterschiede bezüglich der AS-E Aktivität sind nicht festzustellen.

Die Tumorratten zeigen hinsichtlich Brust- und Bauchaorta dieselbe Verteilung und Intensität des Enzyms wie die Normalratten.

TAFEL IV

Naphthol-AS-Esterase

Abb.1

1 Tag alte Ratte,
Thorakalaorta, 120x

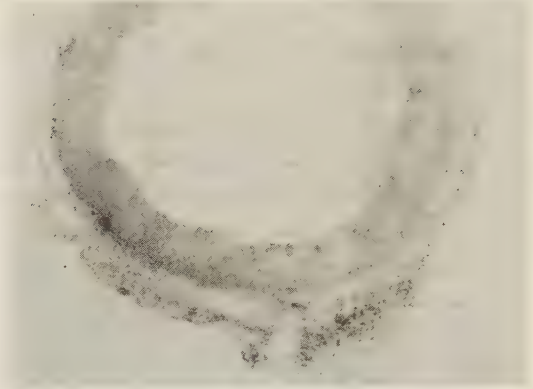


Abb.2

1 Tag alte Ratte, Ab-
dominalaorta, 120x

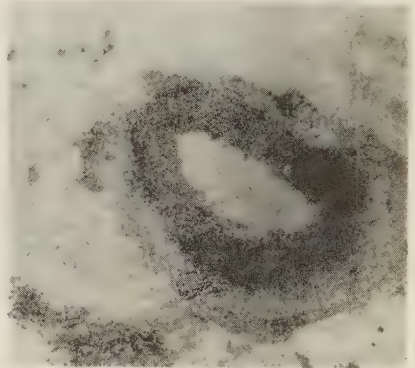
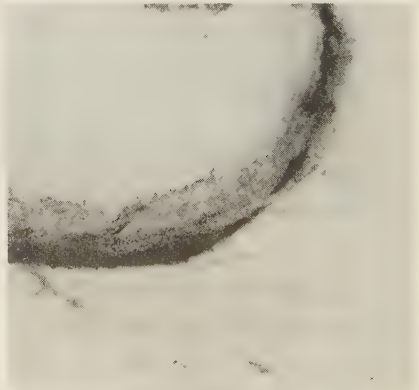


Abb.3

Tumorratte (411/69),
Abdominalaorta, 120x



4. Cholinesterase (3.1.1.8., Acylcholin-acylhydrolase)

ChE katalysiert sowohl die Spaltung von Acetylcholin in Cholin und Acetat als auch die Spaltung von verschiedenen Cholinestern und anderen Estern. Im Gegensatz zu der substratspezifischen Acetylcholinesterase ist die ChE eine unspezifische Cholinesterase.

Die ChE kommt im Endothel nicht vor. In der Media steigt die Aktivität, ebenso wie bei den anderen Esterasen, nach außen hin an (Taf. V, Abb. 1 und 2). Die Adventitia ist, mit Ausnahme vereinzelter Orte mit starker Reaktion (Taf. V, Abb. 3, ↑ bzw. ↑↑), nur schwach aktiv. Unterschiede in der Intensität zwischen Thorakal- und Abdominalaorta sind unregelmäßig vorhanden; das innere Mediadrittel der Abdominalaorta ist dann wie bei uE und AS-E nahezu inaktiv (Taf. V, Abb. 3). Beim neugeborenen Tier scheint an der Grenze zwischen Media und Adventitia die Enzymaktivität am höchsten zu sein (Taf. V, Abb. 1).

Mit dem Alter wird die Reaktion der ChE intensiver. Weibliche Ratten zeigen wiederum stärkere Aktivität als männliche.

Die Tumorratten weisen in Brust- und Bauchorta die gleiche Enzymverteilung und -intensität auf wie die Kontrolltiere.

II. Glycosidasen

β-Glucuronidase (3.2.1.31., β-D-Glucuronid-glucuronohydrolase)

Es handelt sich um ein lysosomales Enzym, das die hydrolytische Spaltung von Glucuroniden in Alkohol und Glucuronsäure katalysiert. Die β-Gr spielt eine Rolle im Mucopolysaccharidhaushalt des Bindegewebes. Die Mucopolysaccharide werden zuerst durch das Enzym Hyaluronidase in Oligosaccharide, die mit Glucuronsäure glycosidisch verbunden sind (=Glucuronide), gespalten, diese wiederum von der β-Gr in die oben

Cholinesterase

Abb.1

1 Tag alte Ratte, Abdominalaorta, 120x

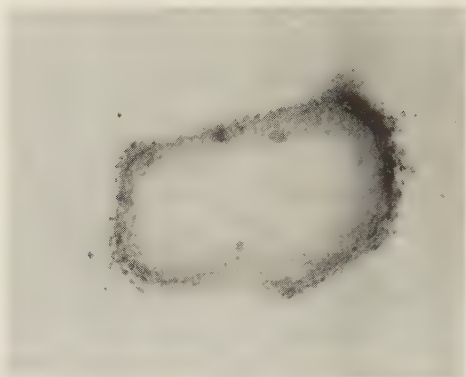


Abb.2

6 Monate alte Ratte, Thorakalaorta, 48x

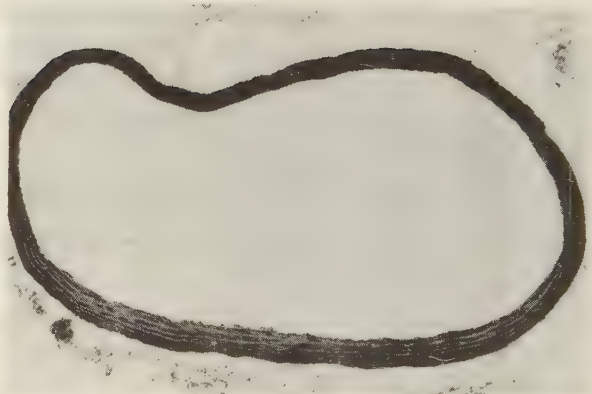
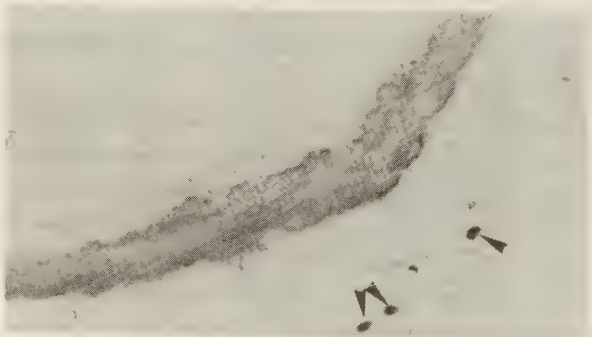


Abb.3

6 Monate alte Ratte, Abdominalaorta, 120x



TAFEL VI

β -Glucuronidase

Abb.1
Rattenfetus,
Thorakalaorta,
120x

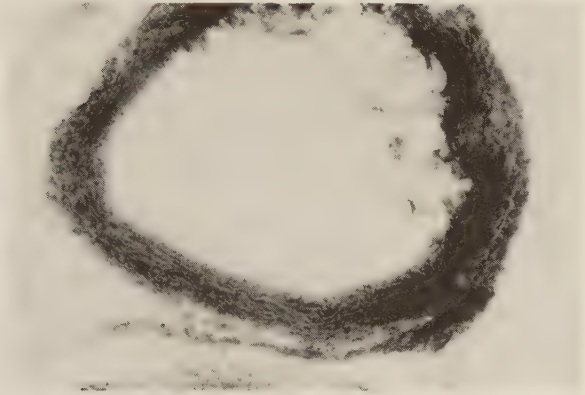


Abb.2
8 Tage alte Ratte,
Thorakalaorta, 120x

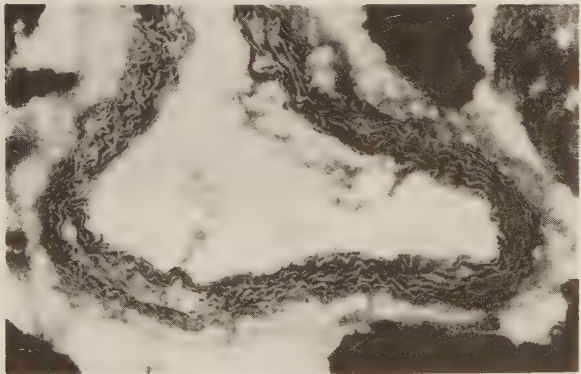
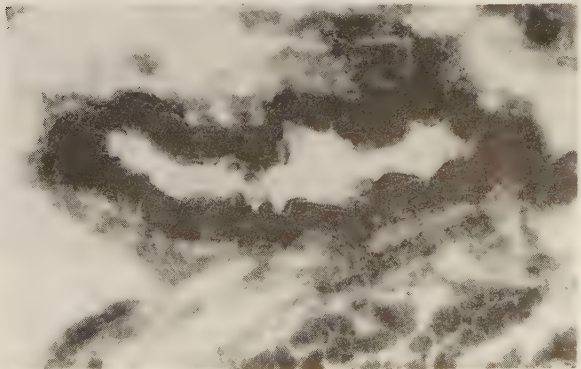


Abb.3
8 Tage alte Ratte,
Abdominal-
aorta, 120x



TAFEL VII

β -Glucuronidase

Abb.4

Tumorratte (32/
70), Thorakal-
aorta, 120x

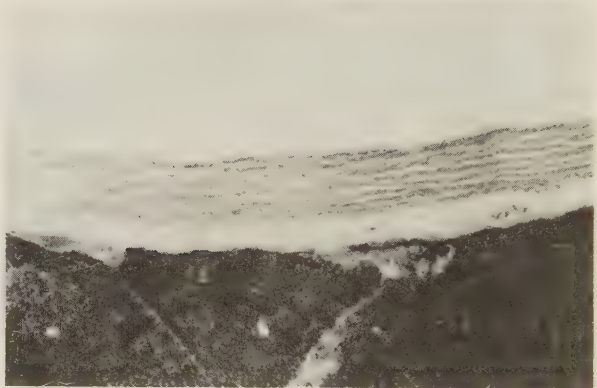
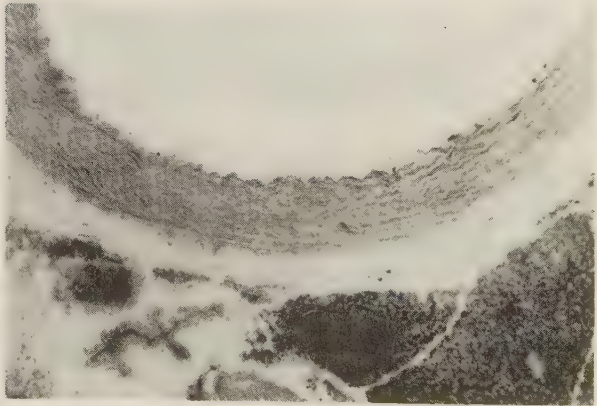


Abb.5

Tumorratte (32/
70), Abdominal-
aorta, 120x



genannten Reaktionsprodukte. Auch eine synthetisierende Rolle bei der Bildung von Mucopolysacchariden wird angenommen (STOLK 1962).

Die β -Gr ist in allen Schichten der Aortenwand positiv. Unterschiede zwischen Brust- und Bauchaorta ergeben sich nur bei 3 Wochen alten und jüngeren Ratten (Taf. VI, Abb. 2 und 3), bei denen die Bauchaorta durch eine stärkere Reaktionsintensität gekennzeichnet ist. Bei erwachsenen Tieren (Taf. VII, Abb. 4 und 5) unterscheidet sich die Bauchaorta hinsichtlich ihrer Enzymaktivität nicht von der Brustaorta.

Die Enzymintensität nimmt bei der wachsenden Ratte bis etwa 3 Wochen zu (Taf. VI, Abb. 1, 2 und 3), sie fällt dann ab und steigt mit 12 und 18 Monaten wieder an.

Weibliche Ratten zeigen eine stärkere Aktivität als gleichalte, männliche Tiere.

Die Aktivität bei den Tumorratten entspricht derjenigen der gleichalten Kontrolltiere.

III. Peptidasen

Leucinaminopeptidase (3.4.1.1., L-Leucyl-peptid-hydrolase)

LAP ist eine Exopeptidase, d.h., sie spaltet Peptidketten an einer endständigen Säureamidbindung ($\text{--}\overset{\text{O}}{\underset{\downarrow}{\text{C}}}\text{--NH-R}$), dabei wird die betreffende Aminosäure, in unserem Reaktionsablauf das Leucin, frei. Die LAP kommt wahrscheinlich ebenfalls in den Lysosomen der Zelle vor.

Das Enzym ist in allen Aortenschichten nachweisbar (Taf. VIII, Abb. 1, 2 und 3), in der äußeren Media und Adventitia ist die Aktivität besonders deutlich ausgeprägt (Taf. VIII, Abb. 2). Brust- und Bauchaorta weisen in den meisten Fällen gleiche Enzymstärke auf.

Die Intensität der LAP nimmt bei der wachsenden Ratte zu, und bleibt mit 6, 12 (Taf. VIII, Abb. 1 und 2) und 18 Monaten gleich.

TAFEL VIII

Leucinaminopeptidase

Abb.1

6 Monate alte Ratte,
männlich, Abdominalaorta,
120x

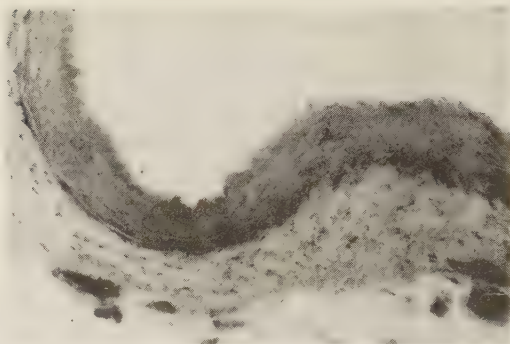


Abb.2

12 Monate alte Ratte,
männlich, Abdominalaorta,
120x

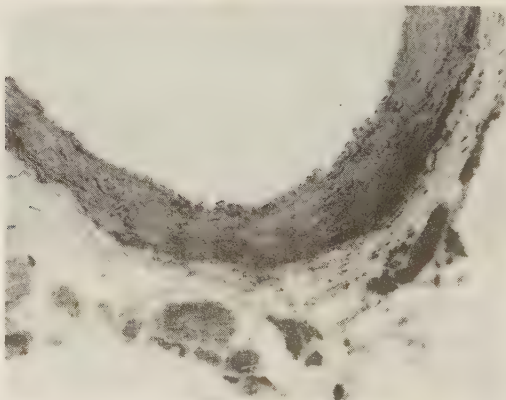
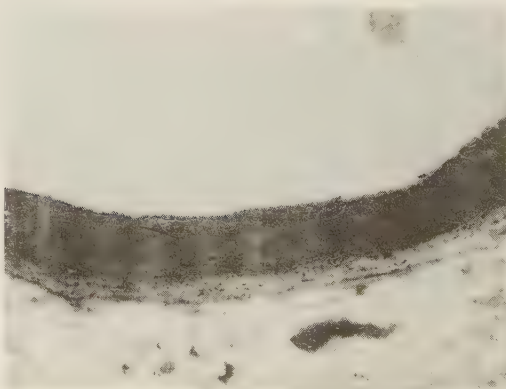


Abb.3

18 Monate alte Ratte,
weiblich, Abdominalaorta,
120x



Die Aortenwand weiblicher Ratten enthält mehr Enzymaktivität als die männlicher Ratten (Taf. VIII, Abb. 2 und 3).

Die Tumorratten zeigen schwächere Intensität und gleiches Verteilungsmuster wie die Kontrollratten.

IV. Polyphosphatasen

Adenosintriphosphatase (3.6.1.3., Adenosintriphosphatphospho-hydrolase)

Dieses Enzym, genauer die ATPmonophosphatase, spaltet von Adenosintriphosphat die endständige Orthophosphorsäuregruppe ab: $ATP + H_2O \rightarrow ADP + PO_4$. In Bindegewebszellen kommt die ATPase in den Mitochondrien vor, in glatten Muskelfasern in den Myofibrillen. Das Adenosintriphosphat stellt einen erheblichen Speicher an chemischer Energie dar. Durch die oben beschriebene Spaltung können hohe Energiemengen freigesetzt und zu Stoffwechselsynthesen verwendet werden.

Das Enzym zeigt Aktivität in allen Schichten der Aorta, besonders ausgeprägt erscheint sie in der Intima und der inneren Media (Taf. IX, Abb. 1). Häufig erweist sich die Bauchaorta aktiver als die Brustaorta.

Die Intensität ist beim Fetus höher als beim neugeborenen Tier. Mit 18 Tagen findet eine intensivere Enzymreaktion statt als mit 1 und 8 Tagen, welche aber mit 5 Monaten wieder schwächer wird und dann gleichbleibt.

Weibliche Ratten enthalten mehr Enzym in der Aortenwand als gleichalte, männliche Tiere.

Das Verteilungsmuster der ATPase stimmt bei den Tumorratten mit dem der Normalratten überein, auch hinsichtlich der Intensität ergeben sich keine nennenswerten Unterschiede.

Adenosintriphosphatase

Abb.1

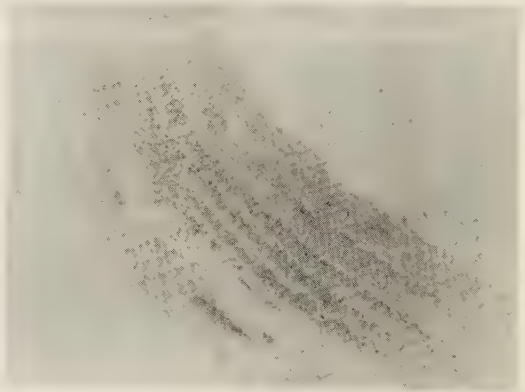
Tumorratte (411/69),
Thorakalaorta, 120x



Monoaminoxydase

Abb.2

6 Monate alte Ratte,
Thorakalaorta,
300x



OXYDOREDUKTASEN

I. Aerobe Transhydrogenasen

Monoaminoxydase (1.4.3.4., Monoamin:Oxygen-Oxydoreduktase)

Die MAO katalysiert den Abbau von Monoamin zu Aldehyd, dabei fallen Ammoniak und Wasserstoffperoxyd an. Auf diese Weise erfolgt im Organismus die oxydative Desaminierung von sympathikomimetischen Aminen, wie Katecholaminen (Adrenalin, Noradrenalin) und Tryptaminderivaten (Serotonin). Das Enzym hilft u.a. den Blutdruck regulieren, indem es die oben genannten Substanzen, die durch Gefäßmuskelkontraktion blutdrucksteigernd wirken, je nach Bedarf abbaut.

Die Enzymaktivität ist bei allen Reaktionen in der Aortenwand sehr schwach, nur in der äußeren Media nimmt sie geringgradig zu (Taf. IX, Abb. 2). Die Abdominalaorta zeigt meistens mehr Aktivität als die Thorakalaorta.

Fetus und neugeborene Ratte entsprechen sich in der Enzymaktivität, diese wächst bis zu 12 Monaten leicht an und nimmt mit 18 Monaten wieder ab.

Ein Geschlechtsunterschied in Bezug auf die MAO ist nicht feststellbar.

Zum Teil entsprechen die Tumorratten in der Enzymintensität den gleichaltrigen Normalratten, zum Teil zeigen sie eine schwächere Intensität.

II. Anaerobe Transhydrogenasen

A. NAD-unabhängige Transhydrogenasen

Succinatdehydrogenase (1.3.99.1., Succinat:Oxydoreduktase)

Das Enzym ist ein Flavoproteid und wirkt im Zitronensäurezyklus, wo es die Bernsteinsäure zu Fumarsäure oxydiert. Die SDH ist eng mit der Atmungskette verbunden. Der bei der Oxydation frei werdende Wasserstoff wird direkt auf das Flavoprotein der Atmungskette

Succinatdehydrogenase

Abb.1
Rattenfetus,
Abdominalaorta,
48x

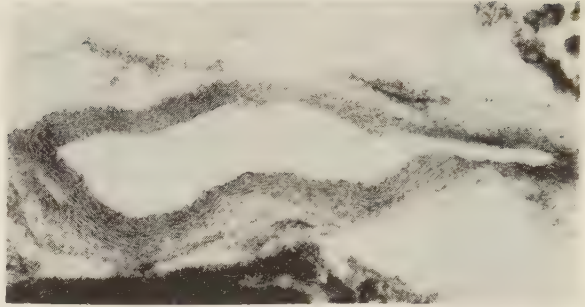


Abb.2
1 Tag alte Ratte, Ab-
dominalaorta, 120x

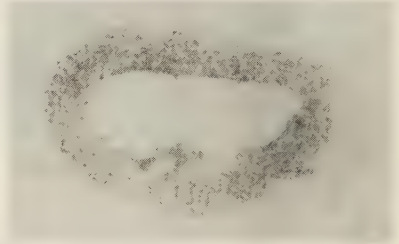


Abb.3
12 Monate alte
Ratte, Abdominal-
aorta, 48x

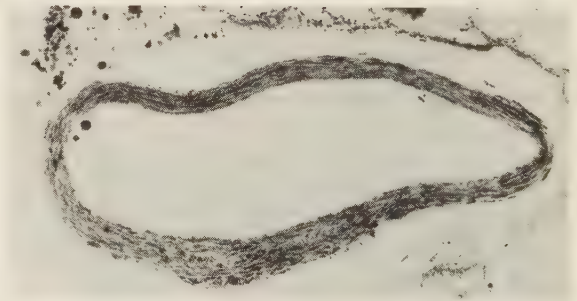
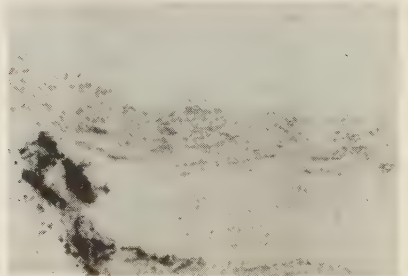


Abb.4
Tumorratte (411/69),
Abdominalaorta, 120x



übertragen.

Die SDH zeigt in Intima, Media - wie bei allen Dehydrogenasen hier ausschließlich in den glatten Muskelfasern - und Adventitia eine positive Reaktion (Taf. X, Abb. 3). Sie ist, verglichen mit den folgenden Dehydrogenasen, schwach, aber deutlich erkennbar. Die Abdominalaorta weist bei jüngeren, bis 6 Monate alten Ratten zum Teil eine stärkere SDH-Reaktion auf als die Thorakalaorta.

Beim Fetus ist eine ausgeprägtere Aktivität als beim neugeborenen Tier zu verzeichnen (Taf. X, Abb. 1 und 2), bei beiden tritt das Endothel deutlich hervor. Die Aktivität nimmt bis zu 12 Monaten zu und bleibt dann bei 18 Monaten gleich.

Weibliche Tiere unterscheiden sich hinsichtlich der Enzymintensität nicht von den männlichen.

Die Versuchsratten erreichen nur eine schwache Intensität, die erheblich unter derjenigen der Kontrolltiere liegt (Taf. X, Abb. 3 und 4).

B. NAD-abhängige Transhydrogenasen

Bei allen Dehydrierungsvorgängen der NAD-abhängigen Transhydrogenasen wird Wasserstoff frei, der von NAD aufgenommen wird. Im Organismus überträgt das nunmehr reduzierte NADH seinen Wasserstoff auf das Cytochromsystem der Atmungskette. In der Histochemie soll aber die vorausgegangene, enzymatische Reaktion sichtbar gemacht werden, darum blockiert man das Cytochromsystem mit Kaliumzyanid und das NADH kann seinen Wasserstoff auf ein Tetrazoliumsalz übertragen, das, zu Formazan reduziert, einen farbigen Niederschlag ergibt. Es können einmal das rot-violette Monoformazan oder das blaue Diformazan entstehen, wobei das letztere eine stärkere Enzymaktivität voraussetzt.

1. Laktatdehydrogenase (1.1.1.27., L-Laktat: NAD-Oxydoreduktase)

Das Enzym katalysiert den letzten Abbauschritt der anaeroben Glykolyse, es oxydiert die Milchsäure zur Brenztraubensäure.

Die LDH bildet neben der NADH-R von allen Dehydrogenasen die höchste Aktivität in der Aortenwand aus. Alle Schichten reagieren positiv, wobei lediglich die Adventitia schwächer erscheint (Taf. XII, Abb. 5). Brust- und Bauchaorta besitzen gleich starke Aktivität (Taf. XI, Abb. 1 und 2, Taf. XI und XII, Abb. 3 und 4).

Die neugeborene Ratte hat eine intensivere Aktivität als der Fetus aufzuweisen, diese nimmt altersbedingt weiterhin zu und fällt erst mit 18 Monaten wieder ab. Bei Ratten, die 5 Monate und älter sind, steigt auch die Intensität innerhalb der Wand zur äußeren Media hin an.

In weiblichen Rattenaorten ist mehr LDH-Aktivität zu verzeichnen als in männlichen.

Die Tumorratten entsprechen in Intensität und Verteilungsmuster den gleichalten Kontrolltieren.

Elektrophoretisch läßt sich die LDH in fünf Proteinfractionen, die LDH-Isoenzyme, auftrennen. Jedes dieser fünf Isoenzyme ist aus vier Monomeren aufgebaut, von denen es zwei Typen - H (Herz-) und M (Muskeltyp) - gibt, die Polypeptide mit verschiedener Aminosäurezusammensetzung sind. Der Anteil der Monomeren H und M variiert innerhalb der einzelnen Isoenzyme, so daß sich fünf verschiedene Isoenzyme ergeben ($LDH_1 = HHHH$, $LDH_2 = HHHM$, $LDH_3 = HHMM$, $LDH_4 = HMMM$, $LDH_5 = MMMM$). Während LDH_1 und LDH_2 vorwiegend in Geweben mit aeroben Stoffwechsel vorkommen, liegen LDH_4 und LDH_5 in Geweben mit anaerober Atmung vor.

Laktatdehydrogenase

Abb.1

1 Tag alte Ratte,
Thorakalaorta, 120x

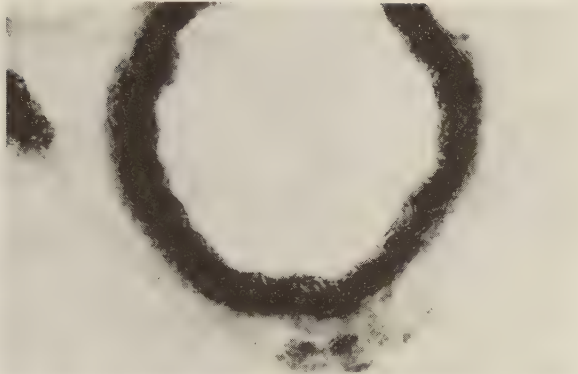


Abb.2

1 Tag alte Ratte,
Abdominalaorta, 120x

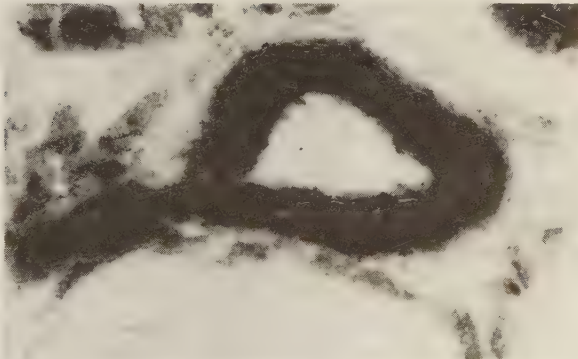
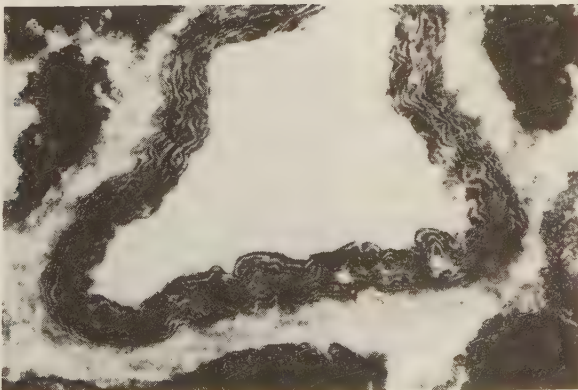


Abb.3

8 Tage alte Ratte,
Thorakalaorta, 120x



Laktatdehydrogenase

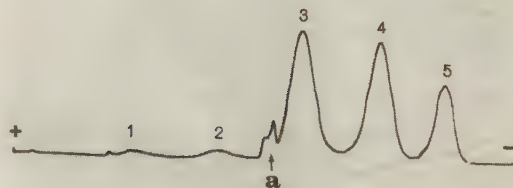
Abb.4
8 Tage alte
Ratte, Ab-
dominalaorta,
48x



Abb.5
18 Monate alte
Ratte, männlich,
Abdominalaorta,
48x



Abb.6
Verteilungs-
muster der LDH-
Isoenzyme in der
Aortenwand einer
12 Monate alten,
männlichen Ratte.
a = Auftragungs-
stelle.



In unserem Versuch beträgt der prozentuale Anteil der schnell wandernden, anodischen Isoenzyme LDH_1 und LDH_2 in der Aortenwand einer 12 Monate alten, männlichen Ratte nur 5,4 % und 4,5 %, während die langsam wandernden, kathodischen Isoenzyme LDH_3 , LDH_4 und LDH_5 mit 38 %, 33,5 % und 18,6 % über zwei Drittel der Gesamt-LDH einnehmen (Taf. XII, Abb. 6).

2. Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (1.1.1.49., D-Glucose-6-phosphat: NADP-Oxydoreduktase)

G-6-PDH bewirkt die Abzweigung aus der Glykolyse in den Pentose-Phosphat-Zyklus. Das Enzym katalysiert die Oxydation von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolacton; der Wasserstoff wird auf NADP übertragen. Der Pentose-Phosphat-Zyklus stellt durch die Freisetzung von 12 Molekülen NADPH pro Molekül Glucose-6-Phosphat einmal einen hohen Energiespeicher dar und ermöglicht zum anderen durch die Pentosebildung die Steroid-, Fettsäure- und Nukleinsäuresynthese.

Die Aktivität der G-6-PDH tritt stark positiv in der Intima der Aortenwand hervor, dagegen ist sie in den glatten Muskelzellen der Media und in der Adventitia nur schwach ausgebildet (Taf. XIII, Abb. 1, 2 und 3). Teilweise geht die starke Enzymaktivität auch auf die innerste Muskellage der Tunica media über (Taf. XIII, Abb. 2). In der Bauchaorta liegt die G-6-PDH in höherer Intensität vor als in der Brusttaorta.

Der Fetus gleicht in der Aktivität dem Neugeborenen und dem 8 Tage alten Tier, bei dem das Endothel besonders intensiv reagiert. Die Aktivität fällt dann und bleibt beim erwachsenen Tier gleich.

Intensitätsunterschiede bei verschiedenem Geschlecht können nicht beobachtet werden.

Die Tumorratten weisen bei gleicher Enzymverteilung in allen Schichten eine stärkere Intensität auf als die Kontrolltiere.

Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Abb.1

1 Tag alte Ratte,
Abdominalaorta,
120x

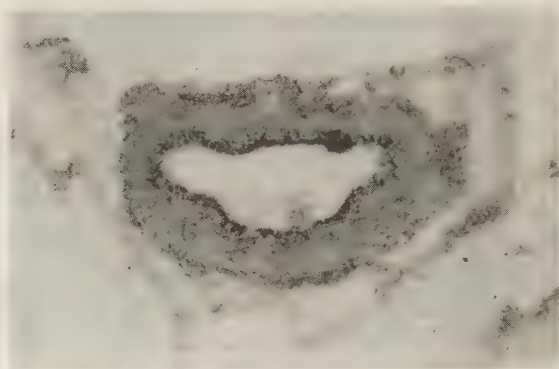


Abb.2

8 Tage alte
Ratte, Thorakal-
aorta, 120x

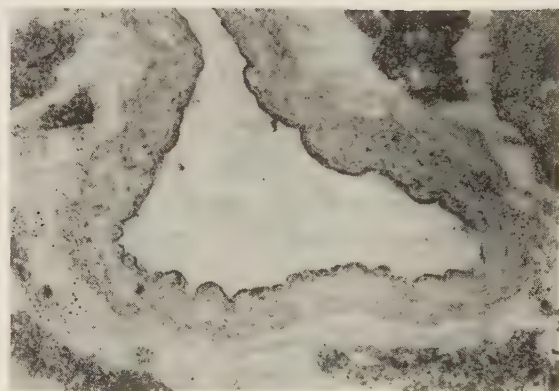


Abb.3

Tumorratte (411/
69), Abdominal-
aorta, 120x



3. β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase (1.1.1.35.,
L-3-Hydroxyacyl-CoA: NAD-Oxydoreduktase)

Die β -HDH spaltet die β -Hydroxybuttersäure, eine Fettsäure mit vier Kohlenstoffatomen. Die OH-Gruppe in β -Stellung wird zur Ketogruppe dehydriert, wodurch Acetessigsäure entsteht; der Wasserstoff wird auf NAD übertragen. Im Organismus oxydiert das Enzym β -Hydroxyfettsäuren mit beliebiger Kettenlänge zu β -Ketosäuren, dabei liegen die Reaktionspartner in aktivierter Form, mit CoA verestert, vor. In dieser allgemeinen Funktion bei der β -Oxydation der Fettsäuren wird das Enzym β -Hydroxyacyldehydrogenase genannt.

Die β -HDH zeigt die gleiche Reaktionsintensität wie die G-6-PDH. Sie reagiert besonders intensiv im Endothel, während Media und Adventitia nur eine schwache Reaktion ergeben (Taf. XIV, Abb. 1, 2 und 3). Die Bauchaorta ist in den meisten Fällen stärker aktiv als die Brustaorta (Taf. XIV, Abb. 1 und 2).

Während sich Fetus und neugeborenes Tier in der Aktivität entsprechen, wächst diese in den ersten Lebenswochen an, dann fällt sie bis zum 5. Monat etwas ab, steigt aber noch einmal geringgradig an und bleibt mit 18 Monaten gleich.

Das weibliche Tier zeigt eine stärkere β -HDH Aktivität als das gleichalte, männliche Tier.

Die Tumorratten sind in ihrer Intensität von den Kontrollratten nicht zu unterscheiden.

4. Glutamatdehydrogenase (1.4.1.2., L-Glutamat: NAD-Oxydoreduktase)

Die GDH bewirkt die oxydative Desaminierung der Glutaminsäure zu α -Ketoglutarat, dabei werden Ammoniak und Wasserstoff frei; letzterer wird auf NAD übertragen. Das Enzym ist ein wichtiges Verbindungsglied zwischen Stickstoff- und Kohlenhydratstoffwechsel (α -Ketoglutarat im Citratzyklus), Einesteils können

β -Hydroxybuttersäuredehydrogenase

Abb.1

1 Tag alte Ratte,
Thorakalaorta,
120x

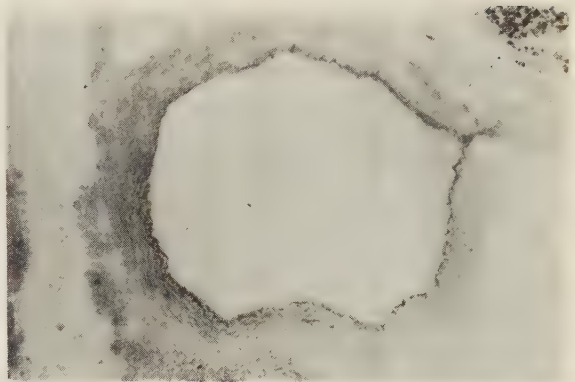


Abb.2

1 Tag alte Ratte,
Abdominalaorta,
120x

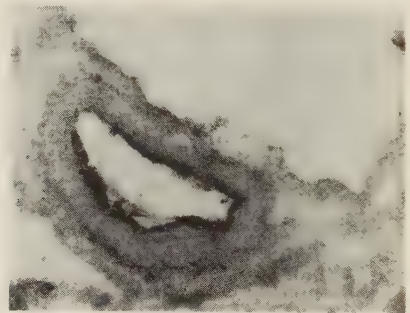
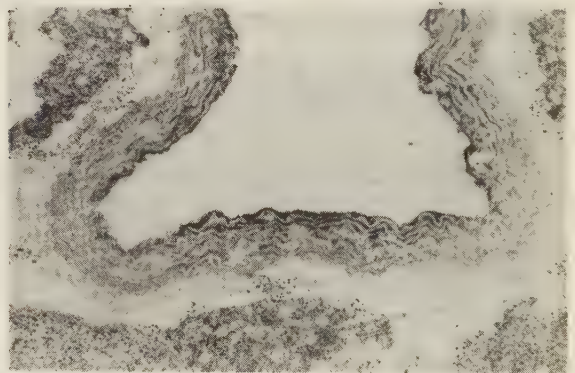


Abb.3

8 Tage alte Ratte,
Thorakalaorta,
120x



Glutamatdehydrogenase

Abb.1
Rattenfetus,
Abdominalaorta,
120x

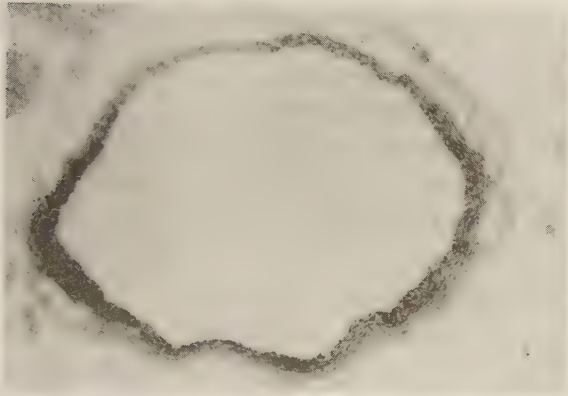


Abb.2
1 Tag alte
Ratte, Thora-
kalaorta, 120x

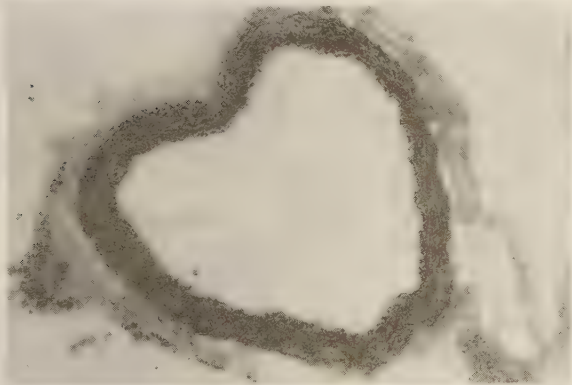
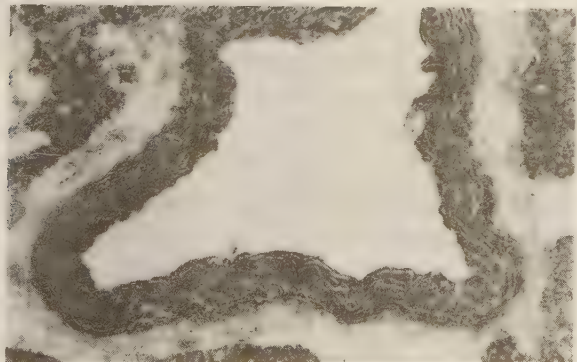


Abb.3
8 Tage alte
Ratte, Thora-
kalaorta, 120x



Glutamatdehydrogenase

Abb.4

12 Monate alte Ratte,
männlich, Abdominalaorta,
120x

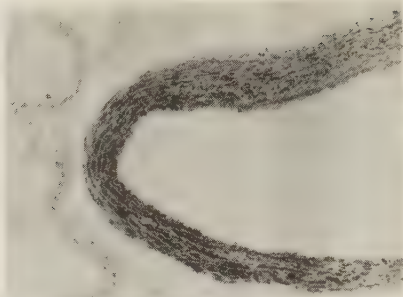


Abb.5

18 Monate alte
Ratte, männlich,
Abdominalaorta,
154x

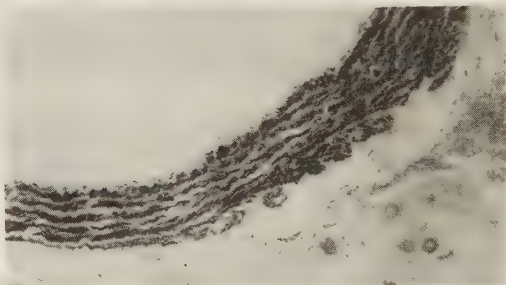


Abb.6

18 Monate alte
Ratte, weiblich,
Abdominalaorta,
300x

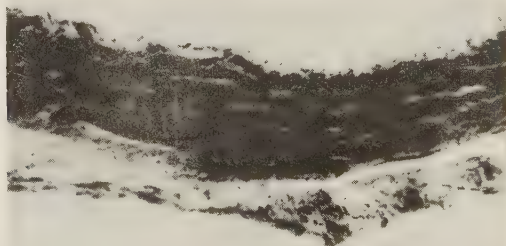
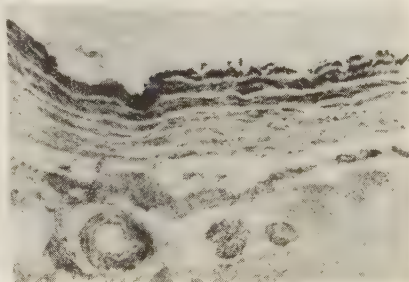


Abb.7

Tumorratte (410/69), Thora-
kalaorta, 154x



Aminosäuren abgebaut und ihr Kohlenstoffgerüst dabei in den Citratzyklus eingeschleust werden, andernteils können aus α -Ketoglutarat und Ammoniak Aminosäuren synthetisiert werden.

Das Enzym reagiert in allen Aortenlagen positiv; besonders intensiv erscheinen in der Brust-aorta (Taf. XVI, Abb. 7) Intima und innere Muskelschichten der Media, während in der Bauch-aorta (Taf. XVI, Abb. 4, 5 und 6) die Aktivität in Intima und Muskellagen der Media gleichmäßig hoch ist.

Die Intensität nimmt mit steigendem Alter kontinuierlich zu (Taf. XV, Abb. 1, 2 und 3, Taf. XVI, Abb. 4 und 5).

Weibliche Ratten verfügen wiederum über eine stärkere Enzymaktivität als männliche Tiere (Taf. XVI, Abb. 5 und 6).

Die Tumorratten weisen ein den Normalratten identisches Verteilungsmuster auf, zeigen aber keine einheitlichen Befunde hinsichtlich der Enzymintensität. Teilweise haben sie die gleiche Intensität, manchmal bilden sie eine schwächere Reaktion als die Kontrolltiere aus.

5. α -Glycerophosphatdehydrogenase (1.1.1.8., L-Glycerol-3-phosphat: NAD-Oxydoreduktase)

Die α -GDH ist ein Verbindungsenzym zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Beim Fettabbau wird phosphoryliertes Glycerin (α -Glycerinphosphat) oxydiert zu Dihydroxyacetonphosphat, das eine Zwischenstufe in der Glykolyse darstellt und dort weiter abgebaut werden kann. Bei Bedarf verläuft der Vorgang auch umgekehrt und es können Triglyceride und Phospholipide synthetisiert werden.

Die α -GDH zeigt sich in allen Schichten der Aorta positiv, Die stärkste Aktivität trifft man - bei Brust-

α -Glycerophosphatdehydrogenase

Abb.1

1 Tag alte Ratte,
Thorakalaorta,
120x



Abb.2

1 Tag alte Ratte,
Abdominalaorta, 120x

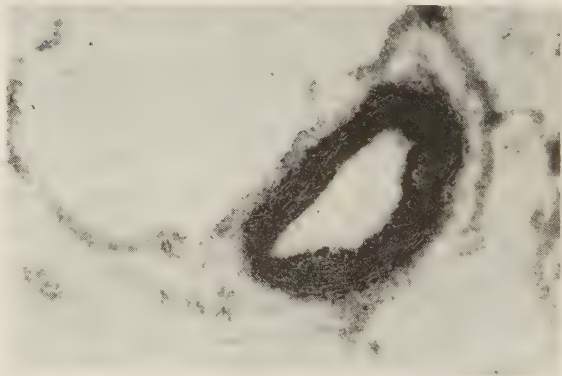
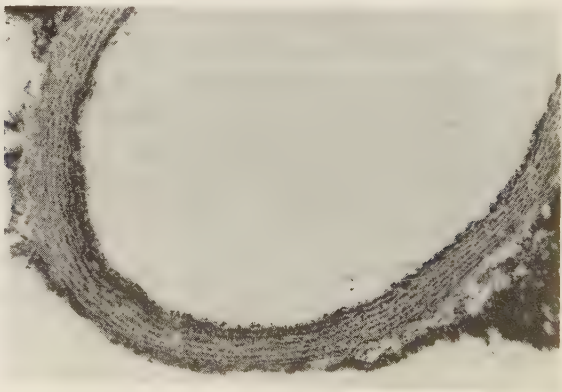


Abb.3

18 Monate alte
Ratte, weiblich,
Abdominalaorta,
120x



und Bauchaorta - in der Intima und inneren Media an (Taf. XVII, Abb. 1, 2 und 3). Von einigen Ausnahmen abgesehen ist - auch bei den Tumorratten - die Brust-aorta aktiver als die Bauchaorta.

Die Intensität der α -GDH nimmt vom Fetus an bis zu etwa 1 Monat zu, dann bleibt sie beim erwachsenen Tier gleich oder wird teilweise schwächer.

Weibliche und männliche Ratten zeigen gleich hohe Enzymaktivität.

Die Tumortiere verhalten sich hinsichtlich Intensität und Verteilungsmuster wie die 12-monatigen Kontrolltiere.

III. Aerobe Transelektronasen

Cytochromoxydase (1.9.3.1., Ferrocytochrom c: Oxygen Oxydoreduktase)

Die Cyt-Ox ist ein Hämoprotein, es katalysiert die letzte Stufe der Atmungskette - die Verbindung des Atmungssauerstoffes mit Wasserstoff zu Wasser. Die Elektronen, die durch die Wertigkeitserhöhung des in der Cyt-Ox enthaltenen Eisen-II-ions zu Eisen-III-ion frei werden, überträgt das Enzym auf den Sauerstoff, der sich mit positiv geladenen H-Ionen zu Wasser verbindet.

Die Cyt-Ox ergibt immer eine sehr schwache Reaktion, am höchsten ist die Aktivität in der Adventitia. Zum Teil erweist sich die Bauchaorta aktiver als die Brust-aorta. Die Intensität nimmt in den ersten Wochen geringgradig zu und bleibt dann beim erwachsenen Tier gleich.

Zwischen männlichen und weiblichen Ratten und zwischen Tumor- und Kontrollratten ergeben sich keine nennenswerten Unterschiede.

IV. Anaerobe Transelekttronasen

NADH-Tetrazolium Reduktase (Diaphorase, 1.6.99.3., Reduziertes NAD: Oxydoreduktase)

Dieses Enzym gehört zur Gruppe der Flavinenzyme, es übernimmt den Wasserstoff vom reduzierten NAD und überträgt ihn auf das Cytochromsystem in der Atmungskette. Das oxydierte NAD steht nun zu neuer Wasserstoffaufnahme zur Verfügung.

Die NADH-R zeigt in allen Schichten eine positive Reaktion, die in Endothel und Adventitia schwächer auftritt als in der Media (Taf. XIX, Abb. 4, 5 und 6). Die Bauchorta enthält mit Ausnahme des Fetus die gleiche Enzymaktivität wie die Brustorta (Taf. XVIII, Abb. 2 und 3).

Von der Fetalperiode an nimmt die Enzymintensität bis zum Alter von 6 Monaten ständig zu. Sie bleibt zunächst gleich stark und fällt mit 18 Monaten wieder ab (Taf. XVIII und XIX, Abb. 1, 2, 3 und 5).

Weibliche Ratten zeigen eine noch stärkere Aktivität als altersgleiche, männliche Ratten (Taf. XIX, Abb. 4 und 5).

Die Tumorratten weisen durchweg eine geringere Aktivität als die Kontrolltiere auf (Taf. XIX, Abb. 6 und 5).

NADH-Tetrazolium Reduktase

Abb.1

Rattenfetus, Ab-
dominalaorta, 120x

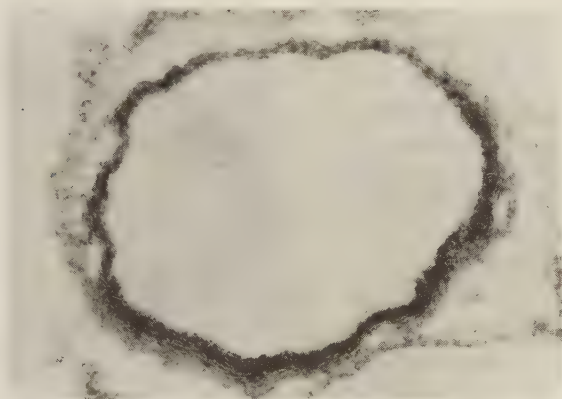


Abb.2

1 Tag alte Rat-
te, Abdominal-
aorta, 120x

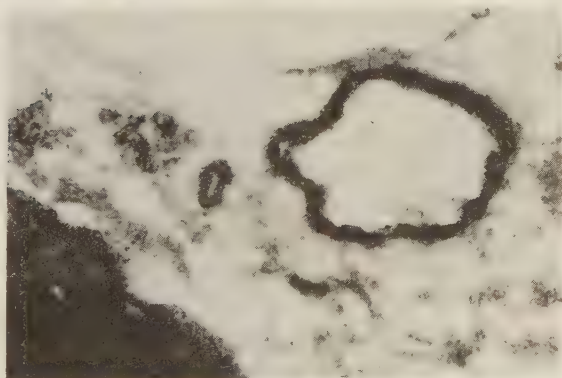
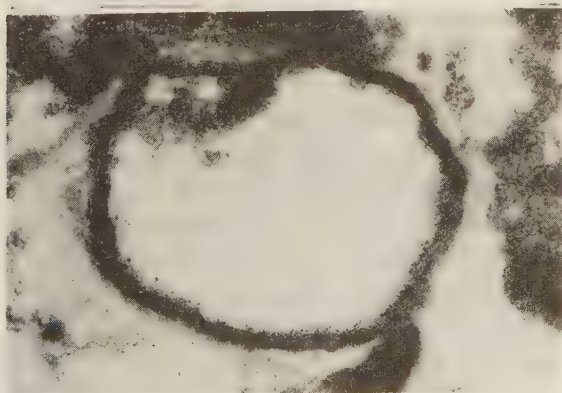


Abb.3

1 Tag alte Rat-
te, Thorakal-
aorta, 120x



NADH-Tetrazolium Reduktase

Abb.4

18 Monate alte
Ratte, weiblich,
Abdominalaorta,
120x

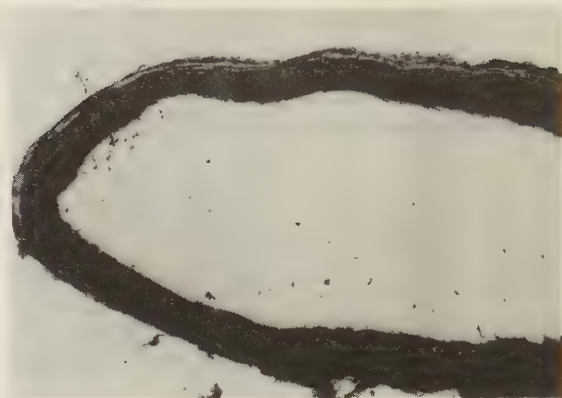


Abb.5

18 Monate alte
Ratte, männlich,
Abdominalaorta,
48x

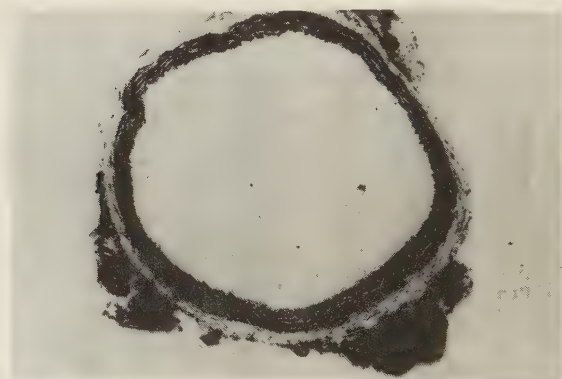
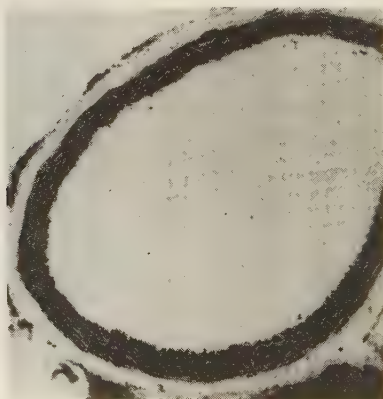


Abb.6

Tumorratte (32/70), Ab-
dominalaorta, 48x



DISKUSSION

I. Zur Topochemie der Enzyme in der Aortenwand.

Die hier vorgelegten, enzymhistochemischen Befunde über die Topochemie der Enzyme in der Aortenwand der Ratte lassen sich mit den Ergebnissen an anderen Tierarten vergleichen.

Das Vorkommen der aPase in der Adventitia der Aorta der Ratte steht mit gleichartigen Ergebnissen an ihr und an Mensch, Hund, Kaninchen und Schwein im Einklang (LOJDA und ZEMPLÉNYI, HESS und STÄUBLI, OKA et al., SANDLER und BOURNE, STAVROU). Die aPase ist in Kollagenfasern und Fibrozyten, hauptsächlich aber in den Endothelien der Vasa vasorum enthalten und soll dort an aktiven Transportvorgängen beteiligt sein. Dies wirft die Frage nach der Versorgung der Aortenwand mit Vasa vasorum und deren Lokalisation auf. Bei der Ratte wird einesteils das Vorkommen von Vasa vasorum überhaupt (WILGRAM und INGLE 1965) oder zumindest in der Media verneint (ADAMS 1967). Dieselbe Ansicht bestätigen auch WOLINSKY und GLAGOV (1967), die durch Zählung der elastischen Faser-Muskel-Lamellen in der Media zu dem Schluß gekommen sind, daß Aortenwandungen, die weniger als 29 solcher Lamellareinheiten besitzen, offenbar ausschließlich durch Diffusion ernährt werden und ohne Vasa vasorum in der Media auskommen. Nachdem die Ratte im Durchschnitt nur 7 Lamellareinheiten besitzt, erscheint das Fehlen von Vasa vasorum auch einleuchtend. Von ZEMPLÉNYI (1968) wurde, allerdings auf histochemische Weise, ebenfalls nur Aktivität der aPase in der Adventitia gefunden, während biochemisch in der von der Adventitia befreiten Aorta aber aPase festzustellen war und deshalb Vasa vasorum in der Media vermutet wurden. In unseren Ergebnissen fand sich vereinzelt aPase innerhalb der Tunica media in der äußeren Hälfte, was auf dort verlaufende Vasa vasorum hinweisen könnte.

Die sPase ist, neben unspezifischen Esterasen, β -Gr und LAP, in den Lysosomen enthalten, wo die Enzyme an intrazellulären Verdauungsvorgängen beteiligt sind. Sie befinden sich dort in einem relativ inaktiven, latenten Stadium und werden erst durch Prozesse aktiviert, die zur Auflösung bzw. Öffnung der Lysosomenmembran führen. So erhöhen z.B. sPase, Tween-E und die unspezifischen Esterasen ihre Aktivität in den Anfangsstadien arteriosklerotischer Prozesse (ADAMS). Bei unseren Untersuchungen war die Aktivität dieser Enzyme und auch der LAP deutlich auf das äußere Mediadrittel (insbesondere in der Bauchaorta) bezogen, in Übereinstimmung mit den Befunden von ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ, HESS und STÄUBLI, und STAVROU. Dies könnte für eine besondere Anfälligkeit der äußeren Media, die durch Diffusion aus dem Lumen nur noch unzureichend und von den Vasa vasorum nicht mehr ernährt wird (vorausgesetzt, daß die Vasa vasorum hauptsächlich in der Adventitia vorkommen), und einem durch die Enzyme bereitgestellten Abwehrmechanismus sprechen. Für die Abwehrfunktion der lysosomalen Enzyme dürfte die Ratte ein Beispiel sein mit ihrer im Vergleich zu anderen Tierarten hohen lipolytischen und esterolytischen Aktivität und ihrer relativ geringen Anfälligkeit für arteriosklerotische Krankheitsbilder.

Auch die Cholinesterase zeigte ein den Esterasen sehr ähnliches Verteilungsbild in der Aorta. Während die Acetylcholinesterase (AChE) in Nervengeweben und motorischen Endplatten vorkommt und durch Hydrolyse von Acetylcholin einen neuen Reizimpuls ermöglicht, scheint die Funktion der Cholinesterase unbekannt. Da AChE und ChE beide auf dasselbe Substrat, Acetylcholin, wirken, stellt sich die Frage nach ihrem anteilmäßigen und morphologischen Vorkommen in der Aorta. In den histochemischen Untersuchungen von HESS und STÄUBLI bildete die AChE eine höhere Aktivität aus als die ChE, hingegen bewiesen NAVARATNAM und PALKAMA (1966) durch die Verwendung von Inhibitoren, daß die ChE in Rattenaorten vom unspezifischen Typ ist.

Biochemische Daten von THOMPSON und TICKNER (1953) an Kaninchen und Ratten brachten dasselbe Ergebnis. Auch die periarteriellen Nervenplexus in Arterien von Kaninchenohren enthalten hauptsächlich ChE vom unspezifischen Typ (GRANT und THOMPSON 1963).

Zwischen glatten Muskelzellen der Gefäße und Nervenfasern bestehen keine strukturellen Verbindungen (PEASE und PAULE 1960, BOGUSCH 1968), lediglich in der Adventitia scheinen Nervenbündel vorzukommen, die sich in unseren Untersuchungen (Taf. V, Abb. 3, ↑ bzw. ↑↑) durch Stellen starker ChE-Aktivität auszeichneten. Die ChE steuert einesteils die kontraktile Wirkung von cholinergen Substanzen auf die glatte Gefäßmuskulatur, doch scheint sie andernteils mit ihrer geringen Substratspezifität auch andere Ester anzugreifen, worauf die der uE und AS-E ähnliche Topochemie der ChE hindeutet.

Die in unseren Versuchen gefundene schwache Aktivität der SDH und der Cyt-Ox läßt auf eine geringe Beteiligung des Zitronensäurezyklus und der Atmungskette und damit auf einen vorwiegend anaeroben Stoffwechsel in der Aortenwand schließen. Tatsächlich war die LDH-Aktivität sehr hoch, die benötigte Energie wird also hauptsächlich aus der anaeroben Glykolyse gewonnen (nach ADAMS 1964 sogar zu 75 %). Auch bei genügend hohem Sauerstoffangebot wird die Glucose zu einem erheblichen Prozentsatz durch die Glykolyse abgebaut. Das Aortengewebe unterliegt also nicht wie die meisten anderen Organe dem Pasteur-Effekt, d.h., daß bei Anwesenheit von Sauerstoff der vollständige Abbau der Glucose durch den Zitronensäurezyklus eingeschlagen wird.

Die Aortenwand ist dadurch vor einem direkten Sauerstoffmangel relativ gut geschützt, der sich immer dann einstellen wird, wenn der Diffusionsdruck des strömenden Blutes zu schwach ist, um die Wand mit Nährstoffen zu durchdringen (ZEMPLÉNYI 1968). Weiterhin wurde das Überwiegen der Glykolyse in der Aortenwand auf genauere Weise bestätigt durch das in unseren

Ergebnissen gefundene LDH-Isoenzym Verteilungsmuster, das als organspezifisch für die Aortenwand gilt (ZEMPLÉNYI). Aus der graphischen Darstellung von Taf. XII, Abb. 6 geht deutlich hervor, daß die kathodischen Isoenzyme (LDH_3 , LDH_4 und LDH_5) mit Extremwerten gegenüber den anodischen Isoenzymen (LDH_1 und LDH_2) den Hauptanteil der Gesamt-LDH in der Aortenwand ausmachen. Es ist bekannt, daß die kathodischen Isoenzyme auch bei Pyruvatüberschuß katalysieren. Ihre vorherrschende Quantität innerhalb der LDH weist folglich auf die vorwiegend anaerobe Atmung des Aortengewebes hin.

In unseren Untersuchungen ergab sich für die G-6-PDH eine besonders ausgeprägte Aktivität im Endothel und den innersten Zellagen der Media, welche von HESS und STÄUBLI und ZEMPLÉNYI, LOJDA und MRHOVÁ ebenfalls gefunden wurde. Auch β -HSDH, GDH, α -GDH und ATPase traten in diesem Gebiet vermehrt auf. Es scheint sich hier um eine besonders stoffwechselaktive Zone zu handeln mit einem günstigen Sauerstoff- und Nährstoffangebot aus dem Lumen und einer infolgedessen hohen Abbau- und Umbaurate mit erheblichem Energiebedarf, der durch die reichlich vorhandene ATPase aus Adenosintriphosphat freigesetzt werden kann.

II. Aktivitätsunterschiede zwischen Brust- und Bauchorta.

Brust- und Bauchorta unterscheiden sich durch ihre verschiedenen Anteile an glatten Muskelfasern, elastischen und kollagenen Bindegewebsfasern. Während die Bauchorta mehr dem muskulären Gefäßtyp angehört, verkörpert die Brustorta den elastisch-muskulären Typ mit reichlich elastischem Fasermaterial und spärlichem kollagenen Bindegewebe. Innerhalb dieser Strukturelemente stellen die glatten Muskelzellen die stoffwechselaktivste Komponente dar.

In unseren Untersuchungen bildeten die meisten Enzyme in der Bauchorta eine intensivere Reaktion aus als in

der Brusttaorta. Die vermehrte Aktivierung könnte durch die höhere Anzahl stoffwechselaktiver Muskelzellen in der Bauchtaorta bedingt sein.

Während bei einigen Enzymen - wie LDH, NADH-R, β -Gr, LAP und bei SDH ab 6 Monaten - die Verteilung über die beiden Aortensegmente gleichmäßig war, zeigten die unspezifischen Esterasen und die α -GDH einen höheren Aktivitätsanteil in der Brusttaorta. Diese letztgenannten Enzyme bewirken die Hydrolyse von Lipiden bzw. ihren Einbau in den Kohlenhydratstoffwechsel; beide Vorgänge bedeuten Abwehrmechanismen gegen Lipidansammlungen (ZEMPLÉNYI) und sind vielleicht u.a. ein Grund für die geringere Anfälligkeit der Brusttaorta gegen arteriosklerotische Läsionen. Für diese Tatsache sprechen auch die folgenden Befunde: der biochemisch gemessene, höhere Sauerstoffverbrauch der Brusttaorta (CHRISTIE und DAHL 1957, MAIER und HAIMOVICI 1958, PRIEST 1963, BURCK und HARTMANN 1963), eine stärkere Glykolyse (SAJKIEWICZ et al. 1968) und eine biochemisch und histochemisch erfaßte, intensivere ATPase Aktivität in der Brusttaorta (KAHN und SLOCUM 1967, SANDLER und BOURNE 1963). Alle drei mitgeteilten Werte zielen auf eine höhere Energiegewinnung in der Brusttaorta hin und stehen damit ebenfalls einer möglichen Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen entgegen.

III. Entwicklung der Aortenwandstruktur und des Enzymmusters im Embryo und post partum.

Bevor wir auf die Entwicklung des Enzymmusters bei der Ratte näher eingehen, scheint es angebracht, die Zellen- und Faserbildung der Aortenwand kurz zu beschreiben, um möglicherweise Aufschluß darüber zu erhalten, warum die Muskelfasern auf Enzymnachweis positiv reagieren, die elastischen Fasern dagegen keine enzymatische Aktivität aufweisen. In unseren Untersuchungen waren elastische Fasern schon beim etwa 18 Tage alten Fetus am Fehlen der enzymatischen Aktivität kenntlich. Sie zeigten noch

nicht die später auftretende, gleichmäßige, zusammenhängende Lamellenstruktur, sondern erschienen kurz und kraus. Diese Kräuselung verschwand aber meist schon beim neugeborenen Tier oder spätestens beim 8 Tage alten Tier.

BENNINGHOFF (1930) beschreibt die Gefäße im menschlichen Embryo als Endothelrohre mit zirkulär geschichteten Mesenchymzellen, aus denen später die Media entsteht. Die *Elastica interna* erscheint in der Aorta im 3. Monat, zugleich treten elastische Fasern an der Oberfläche der Mesenchymzellen auf. Die *Adventitia* erlangt am spätesten ihre typische Struktur, dagegen erscheinen *Vasa vasorum* bereits im 4. Monat. Auch in der vorliegenden Untersuchung über die Ratte war die *Adventitia* als eigene dritte Schicht der Aorta erst mit 8 Tagen, d.h. nach Ausbildung einer *Lamina elastica externa* erkennbar. KARRER (1960) berichtet von Kükenembryonen, daß bereits am 7. Tag extrazelluläres Fasermaterial elektronenoptisch zu erkennen ist, das aber erst am 14. Tag eine elastinspezifische Färbung (Resorcin-Fuchsin) zeigt. In jüngeren Embryonen finden sich nach KARRERS Definition nur Fibroblasten, die elektronenmikroskopisch ein reiches, endoplasmatisches Retikulum aufweisen, während in älteren Embryonen eine Umwandlung von einigen Zellen in Myoblasten bzw. glatte Muskelzellen erfolgt, die nur wenig endoplasmatisches Retikulum und Myofilamente besitzen. PAULE (1963) bestätigt auf Grund elektronenoptischer Untersuchungen in der neugeborenen Ratte das Vorhandensein glatter Muskelzellen als einzigen Zelltyp in der Media. Auch bei der erwachsenen Ratte soll es sich ausschließlich um glatte Muskelzellen handeln, die die Fähigkeit zur Faserbildung besitzen (PEASE und PAULE 1960); damit dürfte eine frühere Ansicht, daß auch Fibroblasten in der Media vorhanden sind, widerlegt sein. Die glatte Muskelfaser scheint also der allein vorkommende Zelltyp in der Aortenmedia zu sein, der alle notwendigen Stoffwechselaufgaben in der Wand übernimmt,

während die elastischen Fasern als Produkte dieser Zelle nur eine mechanische Funktion besitzen und deshalb auch ohne eigene Enzymaktivität sind.

In unseren Untersuchungen nahm die Aktivität der meisten Enzymreaktionen bei der neugeborenen Ratte gegenüber der Fetalperiode zu, in der nur SDH, ATPase (beide insbesondere im Endothel) und Tween-E verstärkt auftraten. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen an der Ratte berichtete ROSSI (1964) von einem Vorkommen hydrolytischer Enzyme, wie aPase, sPase, uE und β -Gr, in der Aortenwand menschlicher Embryonen. Von HOLMES (1955) wurde ChE in der Aorta von menschlichen Feten gefunden.

Bei einigen Enzymen fiel auf, daß ihre Aktivität bei heranwachsenden Ratten höher war als bei erwachsenen. Dies traf in der Rattenaorta, insbesondere im Endothel, für die ATPase, G-6-PDH, β -HDH und α -GDH zu, während KIRK (1969) auf biochemischen Wege an Aorten von Kindern für die drei Dehydrogenasen eine niedrigere Aktivität als bei Erwachsenen feststellte. Dagegen berichtete er von einer stärkeren Cyt-Ox Aktivität bei Kindern, was für die jugendliche Ratte nach unseren enzymhistochemischen Untersuchungen nicht zutraf. Da die Aortenwand bei Ratten ihr hauptsächliches Wachstum in den ersten 25 Tagen post partum erfährt (GILLMAN und HATHORN 1959), kann dies als Ursache für die stärkere Aktivierung von Enzymen bei heranwachsenden Ratten gegenüber erwachsenen angesehen werden. In Übereinstimmung mit biochemischen Befunden an Kindern (KIRK) fanden wir an jungen Ratten ebenfalls eine erhöhte β -Gr in der Aortenwand. Die β -Gr katalysiert die Synthese von Mucopolysacchariden, welche zu diesem Zeitpunkt mehr als sonst zur Faser- und Grundsubstanzbildung benötigt werden. PAULE fand, daß die elastischen Fasern von jungen Ratten PAS-(Periodic Acid Schiffs Reaktion) positiv und die von erwachsenen Ratten PAS-negativ sind, d.h. daß die jugendlichen Fasern Mucopolysaccharide enthalten, womit die erhöhte β -Gr Aktivität in der Aortenwand begründet sein dürfte.

IV. Die Enzymaktivität im Alter.

Während beim alternden Menschen die Intensität sehr vieler Enzyme abnimmt (ADAMS 1964, KIRK 1969), fiel die Aktivität in der Rattenaorta nach unseren Ergebnissen nur bei sPase, MAO, LDH, α -GDH und NADH-R. Die allgemeine Enzymabnahme läuft parallel mit einer Zell- und Sauerstoffabnahme im Alter und einem Verlust an Wasser und Elastin (LINDNER 1969).

Zwar verlor die LDH, wie oben erwähnt, an Gesamtaktivität. Dabei nahm aber die Intensität bei erwachsenen und älteren Ratten zum äußeren Mediadrittel hin zu und war hier stärker als in den inneren Dritteln. Eine solche Zunahme wird auch in der mittleren Zone der menschlichen Aorta quantitativ festgestellt (ADAMS 1967), zusammen mit einer proportionalen Vermehrung der kathodischen LDH-Isoenzyme (ZEMPLÉNYI 1968). Es wird angenommen, daß diese mittleren Lagen im Alter hypoxisch werden, aber durch die LDH-Zunahme, insbesondere der für die anaerobe Atmung zuständigen, langsam wandernden LDH-Isoenzyme, der Sauerstoffmangel kompensiert wird. Bei der Ratte liegt die kritische Zone anscheinend mehr im äußeren Mediadrittel, da hier infolge der intimalen Sklerosierung die Versorgung durch Diffusion vom Lumen her nicht mehr ausreichen könnte und andererseits auch von außen keine Ernährung erfolgt, da nach WOLINSKY und GLAGOV (1967) die Media bei kleinen Säugetieren nicht mit Vasa vasorum versorgt wird.

Im Rahmen unserer Untersuchungen behielten folgende Enzyme in Übereinstimmung mit anderen Angaben ihre Intensität in der Aorta der alternden Ratte bei: SDH, G-6-PDH (KIRK) und ATPase (CARR et al. 1952, SANDLER und BOURNE). KAHN und SLOCUM (1967) dagegen geben für die alte Ratte eine erhöhte ATPase an und KIRK berichtet von einer Abnahme der ATPase und SDH in der Aorta des Menschen.

Eine altersbedingte Aktivitätszunahme zeigte die β -Gr in der Rattenaorta, übereinstimmend mit quantitativen Befunden von KIRK an Mensch und Ratte. Die biochemische Funktion der β -Gr - Synthese von Mucopolysacchariden - trifft mit der Tatsache der Vermehrung von Grundsubstanz im Alter und einer darausfolgenden Sklerosierung der Gefäße zusammen. Einer Abnahme der GDH-Aktivität beim Menschen (KIRK) stand in unseren Versuchen eine Zunahme der GDH bei der Ratte gegenüber. Die unspezifischen Esterasen zeigten bei Mensch (KIRK) und Ratte eine vermehrte Aktivität im Alter.

V. Einfluß des Geschlechts auf die Enzymaktivität der Aortenwand.

Es ist bekannt, daß Geschlecht bzw. Sexualzyklus die Aktivität von Enzymen und damit den Stoffwechsel beeinflussen. Wahrscheinlich sind es die Sexualhormone, die eine Steuerfunktion ausüben. So wurde von v. DEIMLING (1970) quantitativ und histochemisch festgestellt, daß weibliche Rattennieren eine höhere aPase Aktivität aufweisen als männliche und daß im Oestrus die Aktivität im Mark größer ist als im Dioestrus. Die aPase nahm in den Nieren von männlichen Ratten, die kastriert und einer Oestradiolbehandlung unterzogen worden waren, das für weibliche Tiere typische Verteilungsmuster in der Niere an.

MRHOVÁ und ZEMPLÉNYI (1965) prüften an der Ratte die Geschlechtsabhängigkeit von Aortenenzymen: Bei weiblichen Ratten, die eine höhere Aktivität der LDH und Malatdehydrogenase (MDH) zeigten, fiel die Aktivität nach Ovariectomie ab, umgekehrt stiegen bei männlichen Ratten dieselben Enzyme nach Kastration an.

So besaßen weibliche Ratten auch in unseren Versuchen mehr LDH-Aktivität als männliche. Bei den männlichen Ratten sind indessen die kathodischen LDH-Isoenzyme stärker vertreten als bei weiblichen, was auf eine ausgepräg-

tere, anaerobe Atmung in der Aortenwand von männlichen Ratten hinweist (ZEMPLÉNYI 1968). Da zudem auch die MDH des Zitronensäurezyklus in weiblichen Rattenaorten höher ist und dieser eine wesentlich bessere Energieausbeute als die Glykolyse ergibt - 38 Mol ATP statt 2 Mol ATP bei der Glykolyse - läßt dies auf eine größere Gesamtenergiegewinnung bei weiblichen Ratten schließen. Im weiteren spricht dafür auch die intensivere ATPase Aktivität weiblicher Individuen in unseren Ergebnissen und bei KAHN und SLOCUM (1967) und OKA et al. (1968), die allerdings von MHROVÁ und ZEMPLÉNYI bei beiden Geschlechtern gleich aktiv gefunden wurde.

Auch die höheren Lipasewerte in weiblichen Rattenaorten stimmten mit den von SZENDZIKOWSKI et al. (1961 - 1962) biochemisch erhaltenen überein.

Hinsichtlich der β -Gr ergaben sich bei verschiedenen Geschlechtern abweichende Befunde. Während MHROVÁ und ZEMPLÉNYI bei männlichen Ratten eine höhere Aktivität als bei weiblichen erhielten, fanden WEXLER und JUDD (1966) nur in den Aorten der weiblichen Ratten, die mehrmals trächtig gewesen waren und arteriosklerotische Läsionen zeigten, eine β -Gr Aktivität. Unsere Ergebnisse kamen denen von WEXLER und JUDD nahe, allerdings wiesen alle Ratten β -Gr auf, die aber bei alten, weiblichen Individuen erhöht war. Arteriosklerotische Läsionen wurden nicht angetroffen. Durch die veränderte Hormonlage kommt es offenbar nach mehreren Trächtigkeiten zu einer Aktivierung des Mucopolysaccharidstoffwechsels mit Zunahme von Grundsubstanz (WEXLER 1964).

VI. Das Enzymmuster der Tumorratten.

Bei den hydrolytischen Enzymreaktionen zeigten die Tumorratten gegenüber den Normalratten keine Unterschiede, mit Ausnahme der LAP, die bei den Tumorratten schwächer erschien. Ebenso waren von den Oxydoreduktasen die

Enzymaktivitäten der SDH, NADH-R, teilweise auch der MAO und GDH, bei den Tumorratten vermindert, lediglich die G-6-PDH besaß eine stärkere Aktivität als die der Normalratten.

Da durch die verwendeten Kanzerogene eine Alkylierung bzw. Methylierung der Nukleinsäuren am Guanin stattfindet, könnte sich diese Methylierung auch auf die Enzymproduktion und Enzymausstattung in der Aortenwand auswirken. Dies würde wiederum Stoffwechseländerungen nach sich ziehen. So könnte eine Folge der vermehrt gefundenen G-6-PDH die Anregung des Pentose-Phosphat-Zyklus sein, wodurch eine erhöhte Synthese von Nukleinsäurebausteinen erfolgen würde. Auch könnte die allgemein auftretende Schwächung derjenigen Enzyme, die durch Desaminierung bzw. Abbau von Peptiden am Stickstoff-Stoffwechsel beteiligt sind (MAO, GDH und LAP), auf einen verminderten Eiweißabbau schließen lassen.

Zusammenfassend darf gesagt werden, daß mit Hilfe histochemischer Methoden die in der Problemstellung aufgeworfene Frage nach einer altersbedingten, topochemischen Enzymveränderung in der Aortenwand der Ratte insoweit beantwortet werden konnte, als sich in verschiedenen Lebensabschnitten innerhalb der Aortenschichten keine grundlegenden Veränderungen ergeben haben, während der Intensitätsgrad der meisten Enzyme innerhalb verschiedener Altersstufen, bei verschiedenem Geschlecht und in den verschiedenen Aortenabschnitten - in einigen Fällen auch bei den Tumorratten - wechselte.

Zur Beurteilung dieser Intensitätsunterschiede ist anzufügen, daß eine exakte, quantitative Enzymbestimmung nur auf biochemische Weise erreicht werden kann. Eine quantitative Auswertung von histochemischen Befunden muß notwendigerweise oft subjektiv bleiben, insbesondere wenn es sich um Bereiche handelt, in denen die Enzymreaktionen entweder übermäßig kräftig, wie z.B. bei LDH und NADH-R, oder sehr schwach - bei Cyt-Ox oder Tween-E -

ausfallen. So gesehen, bedürfen die Ergebnisse dieser Arbeit, soweit sie Zu- und Abnahme von Enzymen betreffen, noch einer biochemischen Überprüfung und Auswertung.

Allerdings wird von ADAMS (1967) und ZEMPLÉNYI (1968) mehrmals hervorgehoben, daß biochemische und histochemische Ergebnisse über Aortenenzyme vielfach miteinander in Übereinstimmung stehen, und somit wohl auch in unserem Fall an der Rattenaorta eine meßbare Zu- und Abnahme von Enzymen angenommen werden darf.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Brust- und Bauchortenabschnitte von Ratten verschiedener Altersstufen - vom Fetus bis zu 18 Monaten - und von Versuchsratten, die nach Applikation alkylierender Substanzen neurogene Tumoren entwickelt hatten, enzym-histochemisch untersucht.

1. Beim Rattenfetus waren alle überprüften Enzymreaktionen positiv, meist erschienen sie noch nicht mit derselben Intensität wie beim Neugeborenen. Jugendliche Ratten zeigten bei G-6-PDH, β -HDH, α -GDH, β -Gr und ATPase eine stärkere Aktivität als erwachsene Tiere, was mit dem starken Wachstum der Aorta in den ersten 25 Tagen zusammenhängen mag.
2. Die aPase lag vor allem in der Adventitia und vereinzelt in der äußeren Media vor. Die in den Lysosomen enthaltenen Enzyme, wie sPase, unspezifische Esterasen und LAP zeigten ihre höchste Aktivität im äußeren Mediadrittel. Eine schwache SDH und Cyt-Ox Aktivität im Gegensatz zur hohen LDH Intensität ließen die vorwiegend anaerobe Atmung der Aortenwand erkennen, ebenso deutete das Verteilungsmuster der LDH-Isoenzyme darauf hin.
3. In den meisten Fällen war die Bauchorta reicher an enzymatischer Aktivität; in der Brustorta waren lediglich die unspezifischen Esterasen und die α -GDH aktiver.
4. Weibliche Ratten zeigten fast durchweg deutlichere Enzymaktivitäten in der Aortenwand als männliche.
5. Im Alter nahmen einige Enzyme (sPase, MAO, LDH, α -GDH und NADH-R) an Aktivität ab, während β -Gr und unspezifische Esterasen mit einer stärkeren Aktivierung reagierten.
6. Bei den Tumorratten war die G-6-PDH erhöht und SDH, NADH-R, GDH, MAO und LAP waren in ihrer Aktivität vermindert.

SUMMARY

Enzyme-histochemical research was carried out on the thoracic and abdominal aortae segments of rats of various ages - from fetus to 18 months - and of experimental rats which had displayed neurogenous tumours after the application of alkylating substances.

1. All enzyme reactions tested were positive with the rat fetus; however they did not usually appear with the same intensity as they did with the newborn rat. Juvenile rats showed in the case of G-6-PDH, β -HSDH, α -GDH, β -Gr and ATPase a stronger activity than adult rats; this may be due to the intense growth of the aorta in the first 25 days.
2. The aPase was mainly localized in the adventitia and to a slight extent in the outer media. The lysosomal enzymes as for example sPase, nonspecific esterases and LAP showed their highest activity in the outer third of the media. A weak SDH and Cyt-Ox activity in contrast to high LDH intensity let the mainly anaerobe respiration of the aortic wall be recognized, as also did the pattern of the LDH isoenzymes.
3. In most cases the abdominal aorta showed increased enzymatic activity; in the thoracic aorta only the nonspecific esterases and α -GDH were more active.
4. Female rats nearly always showed a clearer enzyme activity in their aortic wall than male rats.
5. With advancing age some enzymes (sPase, MAO, LDH, α -GDH and NADH-R) decreased in activity, while β -Gr and nonspecific esterases reacted with a stronger activity.
6. The tumour-rats showed an increased G-6-PDH and a decreased activity of SDH, NADH-R, GDH, MAO and LAP.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS, C.W.M.: Arteriosclerosis in man, other mammals and birds. *Biol. Rev.* 39, 372-423 (1964).
2. ADAMS, C.W.M.: Vascular histochemistry, Lloyd-Luke, London 1967.
3. ALBRECHT, W.: Die Aktivität der Phosphatasen in der Aortenwand der Ratte nach Gonadektomie, Hypophysektomie, Adrenalektomie und bei experimenteller, renaler Hypertonie. *Z. Naturforsch.* 18b, 871-875 (1963).
4. BARKA, T.: A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase. *Nature* 187, 248-249 (1960).
5. BENNINGHOFF, A.: In: W.v. Möllendorf. Handbuch der mikroskopischen Anatomie VI/1 1930.
6. BOGUSCH, G.: Cholinesteraseaktivität im glatten Penisretraktormuskel der Weinbergschnecke *Helix pomatia* L. *Histochemie* 12, 345-349 (1968).
7. BURCK, H.C. und F. HARTMANN: Beitrag zur Korrelation von Stoffwechselintensität und Wandschaden der Aorta am Beispiel der experimentellen Aortensklerose der Ratte. *Beitr. path. Anat.* 129, 32-52 (1963).
8. BURSTONE, M.S.: New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase). *J. Histochem. Cytochem.* 7, 112-122 (1959).

9. BURSTONE, M.S.: Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. New York/
London: Academic Press 1962.
10. CARR, C.J., F.K. BELL und J.C. KRANTZ: Adenosintriphosphatase activity of the vascular system. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 80, 323-325 (1952).
11. CHRISTIE, R.W. und L.K. DAHL: Dissimilarity in oxygen consumption between the thoracic and abdominal aorta in rats. J. exp. Med. 106, 357-364 (1957).
12. DAVIS, B.J. und L.J. ORNSTEIN: High enzym localisation with a new diazo reagent "Hexazonium pararosaniline". J. Histochem. Cytochem. 7, 297-298 (1969).
13. v. DEIMLING, O.: Enzymarchitektur der Niere und Sexualhormone. Progress in Histochemistry and Cytochemistry 1/1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1970.
14. GILLMAN, T.H. und M. HATHORN: Post-natal vascular growth and remodelling in the pathogenesis of arterial lesions. Schweiz. Z. Path. Bakt. 22, 62-87 (1959).
15. GLENNER, G.G., H.J. BURTNER und G.W. BROWN: The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazolium salts. J. Histochem. Cytochem. 5, 591-600 (1957).
16. GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. Histochemie 1, 48-49 (1958).

17. GOMORI, G.: Microscopic histochemistry. Univ. Chicago Press, Chicago 1952.
18. GRANT, R.T. und R.H.S. THOMPSON: Cholinesterase and the nerve supply to blood vessels in the rabbit's external ear. J. Anat. (Lond.) 27, 7-22 (1963).
19. HASHIMOTO, Y. und S.D. KOBERNICK: Enzyme histochemistry of rabbit aorta in spontaneous lesions and after acute exercise. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 115, 212-215 (1964).
20. van der HELM, H.J.: A simplified method of demonstrating lactic dehydrogenase isoenzymes in serum. Clin. Chim. Acta 7, 124-128 (1962).
21. HESS, R., D.G. SCARPELLI und A.G.E. PEARSE: The cytochemical localisation of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide linked dehydrogenases. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 753-760 (1958).
22. HESS, R. und W. STÄUBLI: The development of aortic lipidosis in the rat. A correlative histochemical and electronmicroscopic study. Amer. J. Path. 43, 301-335 (1963).
23. HIGGINBOTHAM, F.H. und A.C. HIGGINBOTHAM: Histochemical differentiation in Beagle aorta. J. Atheroscler. Res. 8, 37-43 (1968).
24. HOLMES, R.L.: Some features of the ductus arteriosus. J. Anat. (Lond.) 92, 304-309 (1958).
25. KAHN, S.G. und A. SLOCUM: Enzyme activities in aortas of rats fed atherogenic diets. Amer. J. Physiol. 213, 367-372 (1967).

26. KARRER, H.E.: Electronmicroscope study of developing chick embryo aorta. J. Ultrastruct. Res. 4, 420-454 (1960).
27. KIRK, J.E.: Enzymes of the Arterial Wall. Academic Press, New York and London 1969.
28. KNEDEL, M., K. EBERHARD und H. KIRZEDER: Zur Technik der Isoenzym Elektrophorese der Laktatdehydrogenasen in Agar-Gel unter Anwendung einer geregelten Konvektionskühlung. G-I-T 10, 631-636 (1966).
29. LINDNER, J.: In: Schettler-Boyd. Atherosclerosis. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1969.
30. LOJDA, Z. und T. ZEMPLÉNYI: Histochemistry of some enzymes of the vascular wall in experimental rabbit atheromatosis. J. Atheroscler. Res. 1, 101-120 (1961).
31. MAIER, N. und H. HAIMOVICI: Oxidative activity of aortic tissue of man, the rabbit and the dog, with special reference to succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase. Amer. J. Physiol. 195, 476-480 (1958).
32. MRHOVÁ, O. und T. ZEMPLÉNYI: The effect of sex difference and gonadectomy on some aortic enzymes of the rat. Quart. J. Exptl. Physiol. 50, 289-299 (1965).
33. NACHLAS, M.M., D.T. CRAWFORD und A.M. SELIGMAN: The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. 5, 264-274 (1957).

34. NACHLAS, M.M., B. MONIS, A.M. SELIGMAN und D. ROSENBLATT:
Improvement in the histochemical localisation of leucine aminopeptidase with a new substrate L-Leucyl-4-Methoxy-2-Naphthylamide.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 262-265 (1960).
35. NACHLAS, M.M., K.C. TSON, E. De SOUZA, C.S. CHENG und A.M. SELIGMAN: Cytochemical demonstration of succinic-dehydrogenase by the use of a new p-nitro-phenyl substituted ditetrazole.
J. Histochem. Cytochem. 5, 420-437 (1957).
36. NAIK, N.T.: Technical variations in Koelle's histochemical method for demonstrating cholinesterase activity. Quart. J. Microsc. Sci. 104, 89-100 (1963).
37. NAVARATNAM, V. und A. PALKAMA: Cholinesterases in the walls of the great arterial trunks and coronary arteries.
Acta anat. (Basel) 63, 445-448 (1966).
38. OKA, M., S.S. BRODIE und A.A. ANGRIST: Sex-dependent vascular changes in young, adult, aged and hypertensive rats. Amer. J. Path. 53, 127-147 (1968).
39. PAKYKULA, H. und E. HERMAN: Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. J. Histochem. Cytochem. 3, 161-169 (1955).
40. PAULE, W.J.: Electron microscopy of the newborn rat aorta.
J. Ultrastruct. Res. 8, 219-235 (1963).

41. PEASE, D.C. und W.J. PAULE: Electron microscopy of elastic arteries; the thoracic aorta of the rat. J. Ultrastruct. Res. 3, 469-483 (1960).
42. PEARSE, A.G.E.: Histochemistry. Theoretical and Applied. London: Churchill 1961.
43. PÓSZALAKY, Z.: In: Kiszeley-Pószalaky. Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden. Budapest: Akadémiai Kiadó 1964.
44. PRIEST, R.E.: Consumption of oxygen by thoracic and abdominal aorta of the rat. Amer. J. Physiol. 205, 1200-1202 (1963).
45. ROSSI, F.: Histochemie der Enzyme bei der Entwicklung. In: Handbuch der Histochemie VII/4. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1964.
46. SĄJKIEWICZ, K., H.A. HACKENSELLNER und C.H. STEINMANN: Untersuchungen zur Atmung und Glykolyse von Brust- und Bauchaorta des Kaninchens. Z. ges. exp. Med. 148, 115-123 (1968).
47. SANDLER, M. und G.M. BOURNE: Atherosclerosis and Its Origin. New York, Academic Press 1963.
48. SCARPELLI, D.G., R. HESS und A.G.E. PEARSE: The cytochemical localisation of oxidative enzymes. I. DPN-diaphorase and TPN-diaphorase. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 747-752 (1958).
49. SELIGMAN, A.M., K.C. TSON, S.H. RUTENBURG und R.B. COHEN: Histochemical demonstration of β -D-Glucuronidase with a synthetic substrate. J. Histochem. Cytochem. 2, 209-229 (1954).

50. STAVROU, D.: Morphologische und enzymhistochemische Untersuchungen an experimentellen PNS-Tumoren der Ratte. Arch. Geschwulstforsch. 34, 297-308 (1969).
51. STAVROU, D.: Beitrag zur Morphologie und Enzymhistochemie experimenteller Tumoren des Zentralnervensystems der Ratte. I. Morphologische Befunde. Acta neuropath. (Berl.) 15, 220-230 (1970).
52. STAVROU, D.: Morphologische und enzymhistochemische Studie bei der Arteriosklerose des Miniaturschweines unter normalen und experimentellen Bedingungen. (In Vorbereitung).
53. STOLK, A.: Histochemical localization of β -glucuronidase in healing wounds of the natterjack toad. Nature (Lond.) 195, 298-299 (1962).
54. SZENDZIKOWSKI, S., J. PATELSKI und A.G.E. PEARSE: The influence of cholinesterase inhibitors in the lipolytic activity of rat aorta. Enzymol. Biol. Clin. 1, 125-137 (1961-1962).
55. THOMPSON, R.H.S. und A. TICKNER: Cholinesterase activity of arteries. J. Physiol. (Lond.) 121, 623-628 (1953).
56. WEXLER, B.C.: Spontaneous arteriosclerosis of the mesenteric, renal, and peripheral arteries of repeatedly bred rats. Circ. Res. 15, 485-496 (1964).

57. WEXLER, B.C. und I.T. JUDD: Increased aortic β -glucuronidase activity with progressively severe arteriosclerosis in female breeder rats. *Nature* 209, 383-386 (1966).
58. WILGRAM, G.F. und D.J. INGLE: In: Comparative Atherosclerosis. New York: Hoeber 1965.
59. WOLINSKY, H. und S. GLAGOV: Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ. Res.* 20, 409-421 (1967).
60. ZEMPLÉNYI, T.: Enzyme Biochemistry of the Arterial Wall. Lloyd-Luke, London 1968.
61. ZEMPLÉNYI, T. und D. GRAFNETTER: The lipolytic activity of the aorta, its relation to ageing and to atherosclerosis. *Gerontologia* 2, 55-64 (1959).
62. ZEMPLÉNYI, T., E. LOJDA und O. MRHOVÁ: Enzymes of the vascular wall in experimental atherosclerosis in the rabbit. In: Atherosclerosis and Its Origin. New York: Academic Press 1963.

Herrn Prof. Dr. E. Dahme bin ich für die Stellung des Themas und das entgegengebrachte Interesse zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. D. Stavrou für Anleitung und gewährte Hilfe bei der Ausführung der Arbeit.

Frl. D. Wallmann möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken.

LEBENS LAUF

Am 21. November 1944 wurde ich als Tochter des Diplomvolkswirtes Dr. Otto Merkle und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Wallner, in Kempten/Allgäu geboren.

Von 1950 bis 1955 besuchte ich in München die Volksschule, anschließend trat ich in das St. Anna Gymnasium ein und legte dort 1964 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1964 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Tiermedizin, nach drei Semestern wechselte ich über an die Universität München und beendete im Juni 1969 die Tierärztliche Prüfung.

